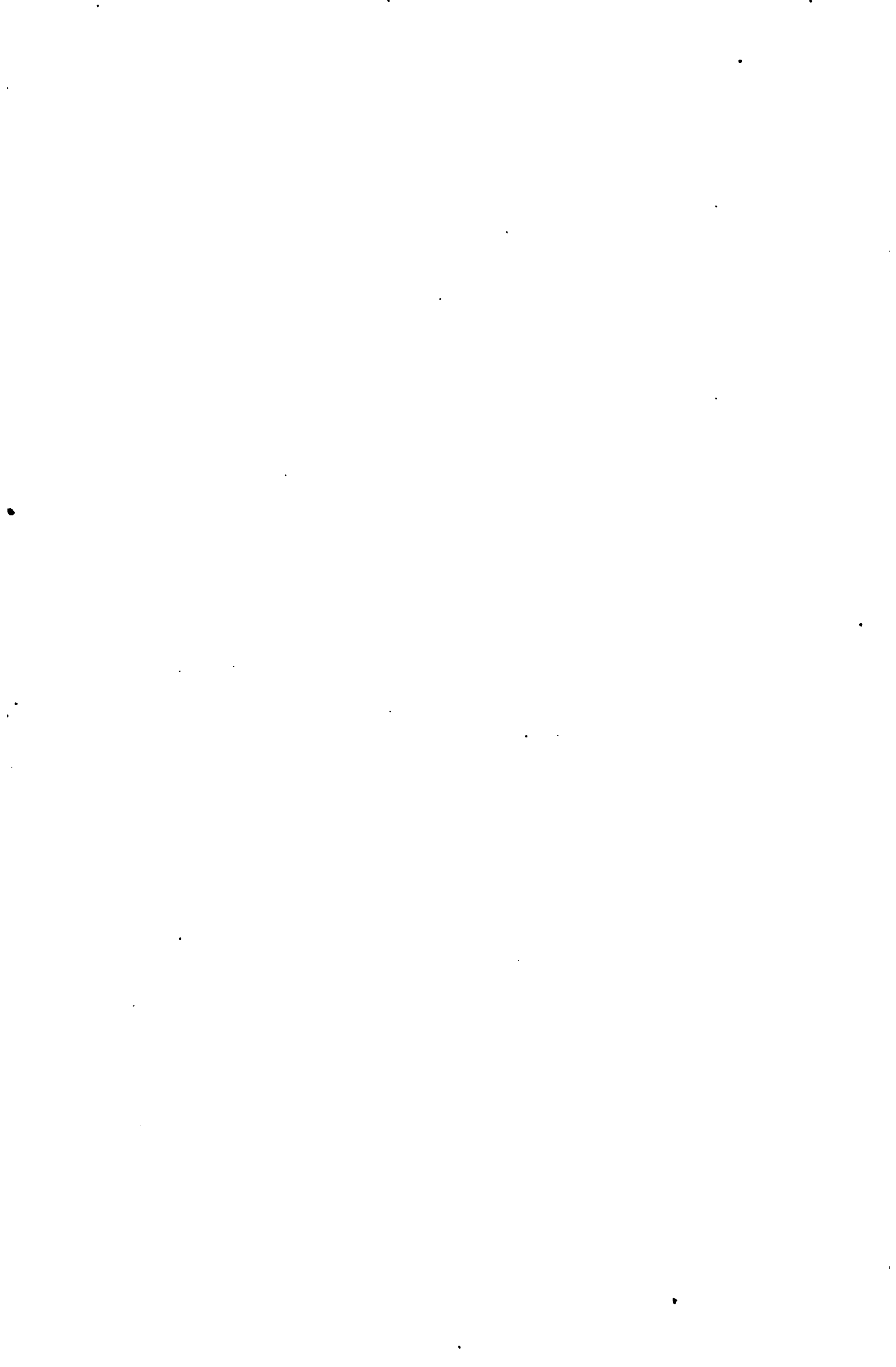

HN 2VQ6 J


SIGILLUM ACADEMIAE HARVARDIANAE IN NOV ANG
CHRISTO ET ECCLESIAE
VE RI TAS





Grundzüge

der

mikroskopischen Technik

für

Zoologen und Anatomen

von

A. B. Lee in **Nyon**

und

Paul Mayer in **Neapel**



Berlin

R. Friedländer & Sohn

1898.

Druck von A. Hopfer in Burg b. M.

Vorwort.

Das Microtomist's Vade-Mecum von A. B. Lee hat in dem kurzen Zeitraum von 1885—1896 vier Auflagen erlebt, und auch seine Uebertragung ins Französische (Traité des méthodes techniques de l'anatomie microscopique, par A. B. Lee et L. F. Henneguy) ist bereits in zwei Auflagen erschienen. Dies zeugt wohl am besten für die Brauchbarkeit des Buches. Ich habe denn auch kein Bedenken getragen, auf den Wunsch des Verlegers eine deutsche Ausgabe davon zu veranstalten; nur bin ich, statt eine blosse Uebersetzung zu bringen, lieber selbständig vorgegangen, soweit dies der Gegenstand überhaupt zuliess. Da heute zu Tage sich wohl kaum Jemand finden dürfte, der sämmtliche Methoden gleichmässig beherrschte oder sie auch nur sämmtlich einmal durchprobirt hätte, so sind gar viele von denen, die Lee in seiner 4. Auflage bringt, auch in das vorliegende Werk übernommen worden, jedoch, wenn dies von mir abhing, nicht kritiklos. Den Methoden, die entweder Lee oder ich für empfehlenswerth halten, ist der breiteste Raum gegönnt worden, während sich die anderen, nach unserem Urtheil entweder minderwerthigen oder nur für ganz spezielle Zwecke brauchbaren oft mit dem Hinweis auf die Literatur haben begnügen müssen. Wo ich Gelegenheit dazu hatte, mir ein selbständiges Urtheil zu bilden, da ist dieses, wenn es von Lees Meinung erheblich abwich, in Anmerkungen niedergelegt worden; diese rühren also alle von mir her. Im Texte hingegen sind Lees Ansichten stets mit Ich eingeführt worden. Einige Abschnitte sind von mir ganz umgemodelt, viele erheblich verändert worden; da sich Lee aber brieflich oder mündlich damit einverstanden erklärt hat, so sind auch diese als gemeinschaftliche Arbeit zu betrachten.

Bekanntlich drückt sich der Engländer schon durch seine vielen Participialkonstruktionen kürzer aus als der Deutsche. Während der

Uebertragung war ich also auf möglichst knappen Ausdruck bedacht und versuchte zugleich, typographisch Raum zu gewinnen, um jene wenigstens nicht voluminöser werden zu lassen als das Original. Das ist mir denn auch über Erwarten gelungen: trotz vieler Einschaltungen aus der Literatur der letzten Jahre nimmt der deutsche Text nur etwa fünf Sechstel des englischen ein! Allerdings sind manche ältere, von Lee noch ausführlich mitgetheilte Methoden stark gekürzt oder sogar nur mit dem Titel verzeichnet worden, indessen allermeist sind die Kürzungen auf Kosten des im Original oft gar breiten, behaglichen Ausdrucks gegangen.

Gründlich umgestaltet sind besonders die Kapitel 27 und 35. Jenes, das die embryologischen Methoden behandelt, war nicht gleichmässig genug geschrieben, und besonders waren die Evertebraten dabei zu kurz gekommen [1]). Ich habe mich bemüht, im neuen Kapitel 24 dem abzuhelfen. Wenn der Leser trotzdem manche Thiergruppe gern ausführlicher behandelt sähe, so möge er nicht vergessen, dass viel öfter, als er glauben wird, in den embryologischen Arbeiten die Methoden entweder gar nicht oder in wenig brauchbarer Weise [2]) angegeben werden. Aehnlich verhält es sich mit Kapitel 35 (jetzt 32), das bei Lee wirklich gar zu knapp weggekommen ist.

Von der neueren und neuesten Literatur habe ich nur nachgetragen oder aufgenommen, was entweder technisch Neues bot oder von ganz bewährten Autoren angegeben wurde. Allerdings war hier mehr denn sonst die kritische Auswahl geboten, denn jedwede noch so kleine Aenderung einer älteren guten Vorschrift bringen hätte geheissen, das Buch unübersichtlich und zu dick zu gestalten, womit dem Leser aber am allerwenigsten gedient wäre.

Der Titel des Buches deckt sich insofern nicht ganz mit dem Inhalt, als die Mittel zur Beobachtung der lebenden oder überlebenden Thiere oder Organe nicht darin behandelt werden. Da aber dieses Kapitel der Mikrotechnik sich fast ausschliesslich um die Anwendung von Apparaten, wie heizbaren Objekttischen, pneumatischen

---

[1]) Im Theil über die Vertebraten sind, wie auch sonst an manchen Stellen des Originals, viele schätzbare Notizen von Henneguy enthalten, die von den französischen Ausgaben in die englischen übernommen worden waren; er hat denn auch nur geringer Zusätze bedurft.

[2]) Z. B. was ist ein „Gemisch von 2 Theilen Jodgrün auf 1 Theil Säurefuchsin in 10 % Glycerin gelöst“? oder eine „Lösung von gleichen Theilen Eosin und Alaun in 200 Theilen Alkohol“?

Kammern, Kompressorien etc. dreht, und Apparate überhaupt in dem Buche nur nebenher erörtert worden sind, so dürfte die absichtliche Auslassung dieses Abschnittes gerechtfertigt erscheinen. Wer sich für das Neueste auf diesem Gebiete interessirt, sei auf Apáthys Mikrotechnik (p. 209 ff.) verwiesen.

Wohl die meisten Citate habe ich selber nachgesehen, somit kontrolirt. Ausser den Originalabhandlungen finden sich im Lee überaus oft die auf den englischen Leser zugeschnittenen Hinweise auf die Referate im Journ. R. Micr. Soc. London und auch in der Zeit. Wiss. Mikr. Ich habe diese als zum mindesten entbehrlich mit Absicht fast überall getilgt und sie nur da belassen, wo die Originale dem Zoologen oder Anatomen schwer zugänglich sind. In vielen Fällen hat nun aber Lee überhaupt die Originale nicht zur Hand gehabt, was ja bei seinem Wohnorte leicht erklärlich ist, und verlässt sich dann auf die Referate, die leider durchaus nicht immer zuverlässig sind. Auch hier habe ich, falls mir ein Verdacht rege wurde, durch Rückgreifen auf die ursprünglichen Arbeiten zu bessern gesucht und thatsächlich auch gebessert.

Die Abkürzungen der Zeitschriften sind genau wie die im Neapler Z. Jahresbericht, wo sie sich seit langen Jahren bewährt haben. Die viel benutzten Lehrbücher aber mögen hier besonders genannt werden, soweit ihr Titel abgekürzt citirt wird; es sind

Behrens, W., Tabellen zum Gebrauch bei mikroskopischen Arbeiten. 2. Aufl. Braunschweig 1892.

Böhm, A., & A. Oppel, Taschenbuch der mikroskopischen Technik. 3. Aufl. München 1896.

Carnoy, I. B., La Biologie cellulaire. Etude comparée de la cellule dans les deux règnes. Lierre 1884.

Flemming, W., Zellsubstanz, Kern- und Zelltheilung. Leipzig 1882.

Fol, H., Lehrbuch der vergleichenden mikroskopischen Anatomie [etc.]. 1. Liefg. Die mikroskopisch-anatomische Technik. Leipzig 1884.

Lee, A. B., & L. F. Henneguy, Traité des méthodes techniques de l'anatomie microscopique. 2. Ed. Paris 1896.

Ranvier, L., Traité technique d'histologie. 1. Ed. Paris 1875—1882. 2. Ed. Paris 1888.

Squire, P. W., Methods and Formulae used in the Preparation of Animal and Vegetable Tissues for Microscopical Examination including the Staining of Bacteria. London 1892.

Whitman, C. O., Methods of Research in Microscopical Anatomy and Embryology. Boston 1885.

Dem alphabetischen Register habe ich nach dem Beispiele von Lee besondere Sorgfalt zugewandt, desgleichen den zahlreichen Verweisungen im Texte auf noch nicht gedruckte Paragraphen. Hoffentlich haben sich nicht gar zu viele Fehler eingeschlichen. Die Nachträge während des Druckes (§ 883—906) sind alle ins Register aufgenommen worden.

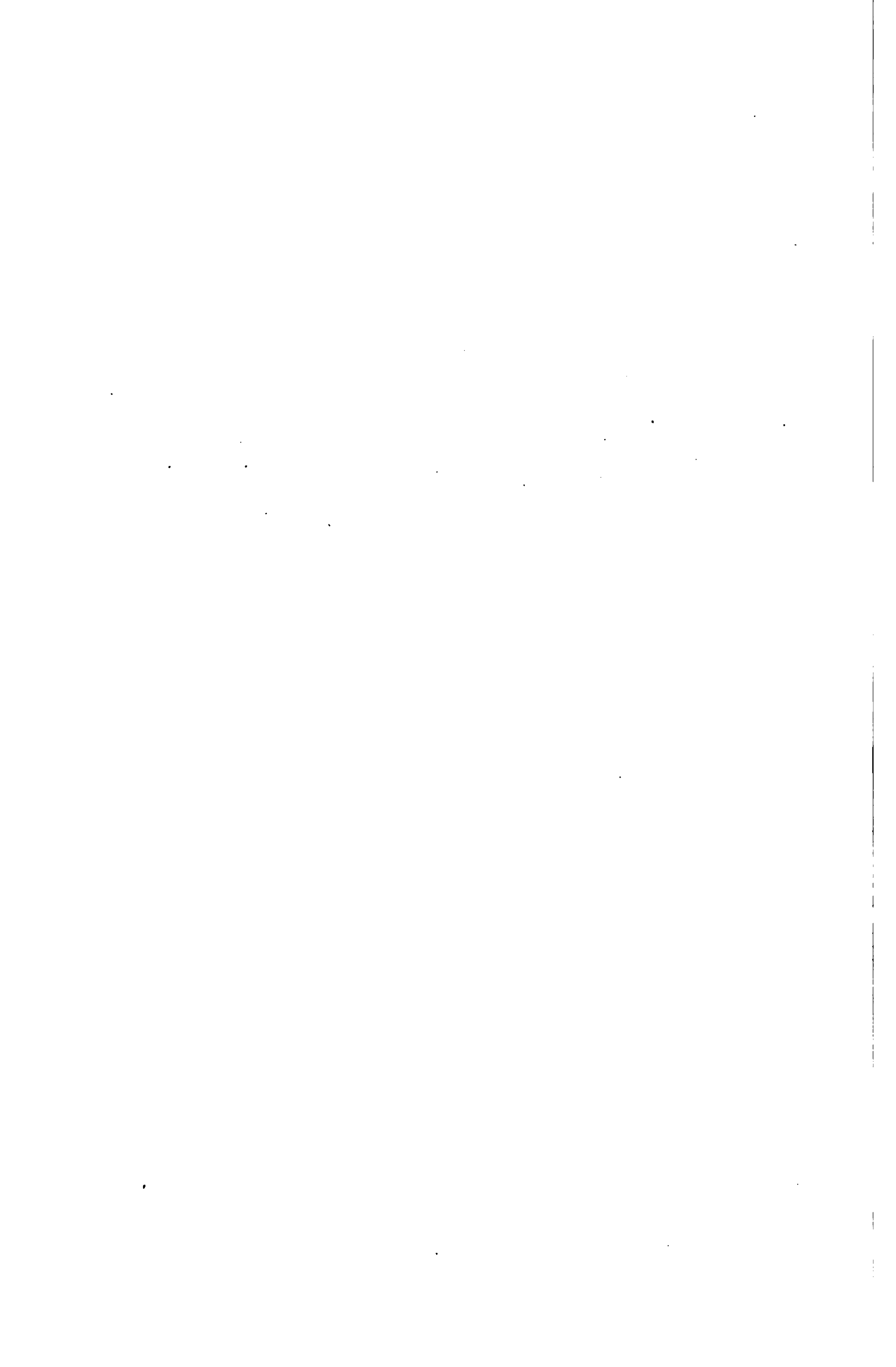
Neapel, Zoologische Station, im Januar 1898.

Paul Mayer.

Berichtigungen.

p. 56 Zeile 8 von unten statt Barium lies Baryum.
p. 140 Zeile 9 von oben statt Czokor lies Csokor.
p. 153 § 252 Zeile 2 statt von Alaun lies von Hämatoxylin, Alaun.
p. 156 Zeile 13 von unten statt (wenn es Schnitte von 10—15 μ sind) lies (wenn Schnitte von 10—15 μ gemacht werden sollen).
p. 198 § 323 statt Groberg lies Gråberg.
p. 211 Zeile 15 von unten statt Hermann lies Herrmann.
p. 246 Zeile 6 u. 7 von oben lies nach Gerlach (Ranvier, Traité 1. Ed. p. 118); nach Thiersch (Arch. Mikr. Anat. 1. Bd. 1865 p. 148).
p. 255 § 520 statt 16. Bd. 1879 p. 471 lies 11. Bd. 1875 p. 449.
p. 275 Zeile 3 von oben statt 583 und 609 lies 583—609.
p. 287 Zeile 7 von unten statt Bruel lies Brüel.
p. 301 Zeile 2 von unten statt 1806 lies 1896.
p. 305 Zeile 6 von oben statt Hermann lies Herrmann.
p. 309 Zeile 3 von oben statt 1876 lies 1875.
p. 345 Zeile 12 von oben statt ibid. lies ibid. 2. Bd. 1885.

Inhaltsverzeichniss.



1. Kapitel.

Einleitung.

1. Allgemeine Methode. In der heutigen mikroskopischen Anatomie darf man neben den vielen speziellen Methoden eine als die allgemeine oder normale ansprechen. Dies ist die Methode der Untersuchung an Schnitten, und sie besteht darin, dass man die Objekte sorgfältig fixirt, dann mit einem Kernfärbmittel färbt, mit Alkohol entwässert und zuletzt die Schnittserien in Balsam bringt. So wird in der Regel eine Untersuchung begonnen und sehr oft auch ganz durchgeführt. Spezielle Punkte hingegen werden eventuell mit speziellen Methoden untersucht, nämlich durch Beobachtung der lebenden Gewebe in situ oder in sogenannten indifferenten Medien, ferner durch Fixirung mit speziellen Fixirmitteln, Färbung mit speziellen Färbmitteln, Dissociation der Gewebselemente durch Zerzupfen oder Maceriren, Injektion, Imprägnation u. s. w.

Aber es lässt sich auch eine andere Unterscheidung machen, insofern nämlich die Präparation der Objekte zur mikroskopischen Untersuchung in zwei Stadien vollführt zu werden pflegt, einem vorläufigen und einem weiteren. Nun sind die Vorgänge bei jenem im Wesentlichen für alle Methoden dieselben, und wichtige Unterschiede treten erst bei den Einzelheiten der weiteren Präparation auf. Als vorläufige Behandlung (§ 2) bezeichne ich das, was man in Deutschland die Konservirungsmethoden nennt, nämlich was den Zweck hat, die Gewebe in einen Zustand zu versetzen, der sie ohne Schädigung alle nur wünschenswerthen weiteren Prozesse ertragen lässt. Hierher gehören das Tödten, Fixiren, Auswaschen und andere Manipulationen zur Entfernung des Fixirmittels aus den Objekten und zu seinem Ersatz durch das definitive Medium oder durch andere Reagentien. (Ueber die weitere Behandlung s. § 3 ff.)

2. Vorläufige Behandlung des Objektes. Was zunächst mit jedem Objekte zu geschehen hat, ist die Fixirung seiner histologischen

Elemente, und dies gilt sowohl für den Fall, dass sie später geschnitten werden sollen, als auch für jedwede andere weitere Behandlung. Die **Fixirung** aber begreift zweierlei in sich: 1. das rasche Tödten des Objektes, sodass es keine Zeit mehr zu Veränderungen seiner Form findet, sondern in der abstirbt, die es im Leben hatte; 2. das Härten des Objektes in solchem Grade, dass es ohne Aenderung seiner Form durch alle weiteren Reagentien passiren kann. Dieser Punkt, der für die heutige histologische Praxis das beste Kennzeichen ist, kann nicht genug betont werden: ohne gute Fixirung keine gute Färbung, keine guten Schnitte oder sonstigen Präparate!

Ist das Objekt wirklich gut fixirt und nöthigen Falles besonders gehärtet — Genaueres hierüber s. in Kapitel 4 und 5 —, so wird es ausgewaschen, um es nach Möglichkeit von den Spuren des Fixirmittels zu befreien.

Es ist durchaus nicht einerlei, womit man auswäscht. Hat man z. B. mit Sublimat oder Osmiumsäure oder einer Flüssigkeit, die Chromsäure oder chromsaure Salze enthält, fixirt, so darf man mit Wasser auswaschen. Hat man hingegen Pikrinsäure in irgend einer Form verwandt, so muss man mit Alkohol auswaschen. Dieser Unterschied beruht darauf, dass die zuerst genannten Reagentien (überhaupt alle Salze von Schwermetallen, die zum Fixiren gebraucht werden) mit den Geweben sich zu Verbindungen umsetzen, die in Wasser unlöslich sind, also auch durch Waschen mit Wasser nicht entfernt werden; Pikrinsäure hingegen härtet die Gewebe nur wenig und scheint auch keine feste Verbindung mit ihnen einzugehen, da sie durch Wasser oder Alkohol völlig daraus weggeschafft wird. Nimmt man nun Wasser zum Auswaschen, so bleiben die Gewebe weich und sind dann der schädlichen Wirkung des Wassers ausgesetzt: deswegen benutzt man Alkohol, der nicht nur die Pikrinsäure entfernt, sondern auch zu gleicher Zeit die Gewebe härtet. Winke über die Art des Auswaschens findet man unten bei den Vorschriften über das Fixiren angegeben, so weit sie nöthig sind.

Nach dem sorgfältigen Auswaschen stehen nun zwei Wege offen: entweder wird das Objekt auch weiterhin nur mit wässerigen Flüssigkeiten behandelt — nasse Methoden — oder es wird entwässert: zunächst mit Alkohol von steigender Stärke, dann mit absolutem Alkohol (von 100 %), dann mit einem Mittel zur Entfernung des Alkohols (gewöhnlich einem ätherischen Oel oder einem Kohlenwasserstoff), um zuletzt direkt in Kanadabalsam (oder ein anderes Harz) gebracht oder zum Schneiden in Paraffin eingebettet zu werden. Im Allgemeinen nun wird die Entwässerung vorgezogen, hauptsächlich weil sie eine bessere Erhaltung der Objekte verbürgt. Die Gegenwart von Wasser nämlich ist von allen Faktoren, welche

die Zersetzung der organischen Materie bedingen, der wichtigste, seine völlige Entfernung daher die Hauptbedingung zu dauernder Konservirung. Hiermit sei allerdings nicht gesagt, man solle die nassen Präparationsmethoden einfach sämmtlich verwerfen: sie sind von grossem Werthe, ja für spezielle Zwecke geradezu unentbehrlich; nur so viel sei gesagt, man möge sie nicht als allgemeine, sondern lediglich als spezielle Methoden betrachten.

3. Weitere Behandlung des Objektes. Bei ihr handelt es sich zunächst um das Entwässern und dann, je nachdem es geschnitten werden soll oder nicht, um das Uebertragen in das Einbettmittel (§ 4 u. 5) oder das Einschliessmittel (§ 4 u. 7).

Während der Ueberschuss des Fixirmittels aus dem Objekte entfernt wird, oder gleich nachdem dies geschehen ist, muss auch das Wasser daraus fortgeschafft werden, und zwar aus zwei Gründen: 1. der Konservirung halber, da ja die Gegenwart von Wasser die Zersetzung des todten Objektes am meisten begünstigt, und 2. weil es die Durchtränkung des Objektes mit der Einbettmasse (für das Schneiden) oder dem Harz (für den definitiven Einschluss) verhindern würde. Wässerige Medien dienen nämlich nur ausnahmsweise zum Einbetten oder Einschliessen (s. hierüber die einschlägigen Kapitel). Zum **Entwässern** nun bringt man das Objekt erst in schwachen und dann gradatim in immer stärkeren Alkohol, bis es zuletzt in absolutem oder wenigstens sehr starkem Alkohol anlangt; in jedem Alkohol muss es so lange bleiben, bis es völlig damit durchtränkt ist. Natürlich muss der Alkohol rein sein, namentlich darf er weder sauer noch alkalisch reagiren (§ 86).

Handelt es sich um äusserst zarte Objekte, so muss man zu besonderen Maassregeln greifen, um die so schädlichen heftigen Diffusionsströme zu verhüten, die beim Uebergang vom Wasser zum Alkohol oder vom schwachen zum starken Alkohol eintreten. In solchen Fällen sind besondere Diffusionsapparate am Platz, z. B. der von Schulze (Sitz. Ber. Ges. Nat. Freunde Berlin f. 1885 p. 175; Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 537). Man bringt die Flüssigkeit mit den Objekten in ein Rohr, das an dem einen Ende zugepfropft, am andern durch eine thierische oder sonst brauchbare Membran verschlossen ist, versenkt das Rohr in Alkohol von der gewünschten Stärke und lässt es so lange darin, bis die Diffusion durch die Membran den Alkohol auch zu den Objekten befördert hat. Auch der Differentiator von Cobb (Proc. Linn. Soc. N.-S.-Wales Vol. 5 1890 p. 157; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1890 p. 821) ist empfehlenswerth, oder als meist noch bequemer der Apparat von Haswell (Proc. Linn. Soc. N.-S.-Wales Vol. 6 1891 p. 433; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1892 p. 696). Dieser besteht aus zwei

Waschflaschen, die mit einander durch ein Glasrohr verbunden sind, und von denen die eine ein Rohr zum Abfluss des Wassers hat, während die andere durch ein Rohr mit einem Hahn von einem höheren Reservoir mit Alkohol von der gewünschten Stärke gespeist wird. Die Objekte kommen mit ihrem Medium in die zuerst erwähnte Flasche, in die andere dagegen giesst man etwas von diesem Medium, und wenn man nun den Alkohol zufliessen lässt, so gelangt er zunächst in die Flasche ohne Objekte, verdünnt sich dort und kann so nur allmählich durch das Verbindungsrohr zu den Objekten hinübertreten. Einen anderen Apparat für rasche Entwässerung hat Cheatle angegeben (Journ. Path. Bact. London Vol. 1 1892 p. 253; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1892 p. 892); es ist eine Modifikation des Extraktionsapparates von Soxhlet und wohl nicht einfach genug, um empfehlenswerth zu sein.

Einen einfachen Apparat, den Capillarheber, zum Absaugen der Flüssigkeiten beim Fixiren, Färben und Auswaschen suspendirter Blutzellen, Spermazellen, Epithelzellen, Infusorien etc. beschreibt Ewald (Zeit. Biol. 34. Bd. 1897 p. 253). Es ist ein Heber von etwa 1 mm Weite; das Ende, das eintaucht, ist wieder nach oben gebogen.

Ich möchte hier auf den Nutzen der Siebdosen von Steinach, Zimmermann und Suchannek hinweisen (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 433 und 7. Bd. 1890 p. 158). Sie bestehen aus einer Glasdose mit Deckel und einem hinein passenden Uhrglas voll Löcher, das auf Füsschen ruht, und sind recht bequem nicht nur zum Färben, Auswaschen, Behandeln mit Dämpfen von Reagentien u. s. w., sondern überhaupt für alle Operationen, wobei die Objekte in den oberen Schichten des Reagens schweben müssen. Die Firma Grübler & Hollborn in Leipzig liefert sie in sehr hübscher Form. Auch Fairchilds Porzellancylinder mit Löchern (Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1896 p. 301) zum Auswaschen sind recht praktisch und noch dazu so klein, dass der Kork, womit sie oben verschlossen werden, sie schwimmend erhält. S. ferner Ewalds Apparate zum Auswaschen von aufgeklebten oder losen Schnitten mit fliessendem Wasser (Zeit. Biol. 34. Bd. 1897 p. 264).

Es wird hier und da angegeben, die Objekte müssten zuletzt unbedingt in absoluten Alkohol gebracht werden. Das ist aber nicht nöthig: meist genügt solcher von 90, höchstens von 95%. Denn das wenige Wasser, das dann noch in den Objekten bleibt, wird durch Einlegen in das sogen. Vorharz (§ 4) entfernt, wenn nur dies wirklich gut ist. So nimmt z. B. Cedernöl das Wasser aus Objekten fort, die in Alkohol von 95% gewesen sind; Bergamottöl thut es schon bei 90%igem und Anilin sogar bei 70%igem Alkohol.

Ich kenne keine Substanz, die beim Entwässern und Aufbewahren den Alkohol völlig ersetzen könnte. Vor Kurzem hat Parker (Z. Anzeiger 15. Bd. 1892 p. 375) Aceton und Methylal zur Entwässerung von Methylenblau-Präparaten angewandt, aber ein vollgültiger Ersatz für den Alkohol bleibt doch noch zu finden. Formaldehyd (s. unten § 90) konservirt Schaustücke für Museen prachtvoll und ist darin dem Alkohol oft gar sehr überlegen, aber wie weit es für histologische Zwecke gut ist, soll noch erst festgestellt werden, und zum Entwässern ist es als wässeriges Medium natürlich gar nicht verwendbar.

Als Agens nur zum Entwässern ist der Alkohol durchaus brauchbar. Dagegen ist er zum Aufbewahren, wenn es sich um histologische Feinheiten handelt, viel weniger gut. Lässt man die Objekte vor der weiteren Behandlung nur einige Tage lang darin, so treten die schlimmen Wirkungen wohl noch nicht besonders unangenehm hervor. Bleibt er hingegen lange Zeit mit den Objekten in Berührung, so verändert er sie oft beträchtlich: sie werden gar zu hart, schrumpfen, brechen leicht und nehmen lange nicht mehr so gut Farbstoffe an wie zuerst. Kultschitzky (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 349) hat darum vorgeschlagen, die Objekte nach dem Färben und Behandeln mit Alkohol in Aether, Xylol oder Toluol aufzuheben. Flemming (Arch. Mikr. Anat. 37. Bd. 1891 p. 685) räth an, sie in einem Gemisch von Alkohol, Glycerin und Wasser zu etwa gleichen Theilen aufzubewahren, und hebt hervor, man könne sie dann jederzeit zum Schneiden durch Behandlung mit reinem Alkohol, zum Zerzupfen oder Präpariren aber durch kurzes Aufweichen in Wasser vorbereiten; auch würden sie nicht so hart und brüchig wie Objekte in reinem Alkohol und behielten auch ihre Anziehungskraft für Farben viel besser. Ich kann nach reiflicher Prüfung diesen Vorschlag nur warm empfehlen, möchte aber glauben, dass die Wirkung des Gemisches oft durch Hinzufügen von etwa $^1/_2$—$^3/_4$% Essigsäure noch viel besser wird.

Material, das lediglich geschnitten werden soll, wird bei Weitem am sichersten gleich in Paraffin gebracht. Diese Prozedur gewährt, so weit ich sehe, eine absolut sichere Konservirung. Vor Kurzem habe ich Objekte verarbeitet, die auf diese Art vor 7 Jahren konservirt worden waren: die Gewebe scheinen bis zu den feinsten Einzelheiten in den Zellen ganz tadellos erhalten zu sein und färben sich auch, obwohl vielleicht etwas langsamer, doch genau so präzis, als wenn sie ganz frisch eingelegt worden wären, oder wohl noch präziser. Nur das ist mir aufgefallen, dass sie ziemlich brüchig sind und sich nicht gut schneiden lassen, aber es ist ja nicht ausgeschlossen, dass sie nicht von vorne herein zu stark gehärtet wurden. Cedernöl ist übrigens in dieser Beziehung fast ganz oder wohl genau so gut wie Paraffin.

4. Entfernen des Alkohols durch Vorharze. Ist das Wasser ordentlich aus den Geweben weggeschafft worden, so entfernt man nun den Alkohol und ersetzt ihn durch eine wasserfreie Substanz,

meist ein ätherisches Oel, das sich mit dem Einbett- oder Einschliessmittel klar mischen lässt. (Man nennt diese Operation gewöhnlich das Aufhellen; s. Kapitel 6.) Dabei ist es sehr wichtig, die Objekte aus dem Alkohol in das neue Medium (Vorharz) nur gradatim zu bringen, und dies erreicht man, wenn man das Medium unter den Alkohol fliessen lässt. Man gibt zunächst eine genügende Menge Alkohol in einen Glastubus (ein Uhrglas geht auch, aber Tuben sind in der Regel besser hierfür) und lässt dann mit einer Pipette das Vorharz auf den Boden des Tubus gelangen. (Oder umgekehrt: zuerst das Vorharz in den Tubus und dann den Alkohol vorsichtig darüber!) Jedenfalls mischen sich beide Flüssigkeiten nur langsam. Lässt man nun die Objekte ruhig in den Alkohol hinein sinken, so schwimmen sie Anfangs auf der Grenzfläche zwischen beiden Medien und sinken in Folge der langsamen Mischung ganz allmählich hinunter in die schwerere Flüssigkeit. Sind sie auf dem Boden des Tubus angelangt, so entfernt man den Alkohol mit einer Pipette und hat so die Objekte ganz vom Vorharz durchtränkt. (Diese Methode der langsamen Ueberführung ist allgemein anwendbar, wenn Objekte aus leichteren Flüssigkeiten in schwerere sollen, z. B. aus Alkohol oder Wasser in Glycerin.)

In diesem Stadium führt man auch am besten feine Zergliederungen mit der Nadel aus, falls sie überhaupt vorgenommen werden müssen (s. § 8).

Von hier ab trennen sich die Wege, die das Objekt einzuschlagen hat, je nachdem es ohne Weiteres in Balsam etc. gebracht (§ 7) oder erst in Schnitte zerlegt werden soll (§ 5).

5. Einbetten und Behandeln der Schnitte. Die Objekte werden nun eingebettet: man nimmt sie aus dem Vorharz heraus und lässt sie sich mit dem Einbettmedium gründlich durchtränken. Dies besteht für kleine Objekte gewöhnlich aus geschmolzenem Paraffin, für grosse dagegen gewöhnlich aus einer Lösung von Kollodium oder Celloidin (in diesem Falle kann man sich das Vorharz sparen und die Objekte direkt aus dem Alkohol einbetten). Dann lässt man die Einbettmasse mit den Objekten darin hart werden (s. Kapitel 7 und 8) und schneidet sie mit dem Mikrotom. Die Schnitte klebt man auf den Objektträger fest (s. Kapitel 9), entfernt das Einbettmittel, wenn es Paraffin war, färbt sie auf dem Objektträger, entwässert sie mit Alkohol und bringt sie durch ein Vorharz in Balsam oder ein anderes Harz. Man kann sie aber auch unaufgeklebt in Uhrgläsern färben, auswaschen,

entwässern etc., wobei man nöthigenfalls die Einbettmasse vorher auflöst.

Es ist nur selten nöthig oder vortheilhaft, die Einbettmasse aufzulösen: Celloidinschnitte färben sich auch so ganz gut und werden meist sammt dem Celloidin entwässert und in Harz gebracht, weil darin das Celloidin ganz durchsichtig wird. Diese Methode ist für grosse Schnitte deswegen vorzuziehen, weil bei sämmtlichen Operationen alle Theile des Schnittes vom Celloidin zusammengehalten werden.

Das Färben der Schnitte auf dem Objektträger ist ziemlich neuen Datums. Früher färbte man die Objekte in toto und schnitt sie dann. Soll das geschehen, so wird das fixirte und ausgewaschene Objekt entweder direkt aus dem Wasser oder aus schwachem Alkohol (wenn es irgend angeht, so vermeide man vor dem Färben die stärkeren Alkohole) in das Färbgemisch (meist alkoholisches Boraxkarmin oder eine andere alkoholische Tinktur) gebracht; hat es dann die richtige Zeit darin verweilt, so wird es mit Alkohol gradatim entwässert, in Paraffin gebracht und geschnitten; die Schnitte aber werden nun aus dem Solvens des Paraffins, also Chloroform, Benzol etc., direkt in Balsam übergeführt. Will man wässerig färben, und dies ist mitunter für gewisse Zwecke durchaus erwünscht, so geschieht dies entweder mit den Objekten in toto gleich nach dem Fixiren und Auswaschen oder mit den Schnitten auf dem Objektträger, und man bringt sie deswegen erst in immer schwächere Alkohole, bevor man sie in das Färbbad gibt (nicht nöthig nach Härtung mit Chromsäure, s. § 9).

Im Allgemeinen färbt man Material, das geschnitten werden soll, am besten nicht im Stück: man spart nicht nur sehr viel Zeit,[1]) wenn man die Schnitte färbt, sondern kann auch die Färbung besser kontroliren, überdies manche vorzügliche Farbstoffe anwenden, die sich zur Tinktion in toto gar nicht eignen.

Die besten Gefässe zum Färben, Auswaschen etc, von aufgeklebten Schnitten sind wohl hohe, unten flache Glastuben mit Korken darauf. Meine sind 10 cm hoch und 27 mm im Lichten; in jeden stellt man 2 Objektträger (von englischem Format) mit der freien Fläche gegeneinander, sodass die Schnitte nicht beschädigt werden können. Die Tuben kann man sicher aufstellen, wenn man in ein dickes Brett mit dem Centrumbohrer etwa 15 mm tiefe Löcher von der richtigen Weite bohrt. Nimmt man ein Brett von 45 cm Länge und 15 cm Breite, so fasst es bequem 3 Reihen zu je 7 Tuben, also mehr als man für alle Operationen braucht.

6. Ueberblick über die Schnittmethode. In der 1. Auflage der englischen Ausgabe dieses Buches wurde angegeben, man mache die allermeisten Präparate so, dass man die Objekte mit Sublimat oder einer Verbindung von Pikrinsäure fixire, mit Alkohol auswasche, mit alkoholischem Boraxkarmin färbe, durch Chloroform in Paraffin einbette,

---

[1]) Mir erscheint dies fraglich, ja ich möchte eher das Gegentheil behaupten. Jedenfalls ist für gewöhnliche Untersuchungen, wo es nicht auf histologische Feinheiten ankommt, das Stückfärben um Vieles bequemer. [M.]

mit dem Schlittenmikrotom schneide und die Schnittreihen in Kanadabalsam aufhebe. Seither jedoch hat sich die histologische Praxis stark geändert, und ich möchte jetzt folgenden Weg als den bei Weitem gebräuchlicheren hinstellen: man fixirt mit Sublimat oder besser noch in manchen Fällen mit Flemmingscher Chromosmiumessigsäure oder einem anderen von den weiter unten empfohlenen Gemischen, wäscht aus, entwässert, bettet durch Cedernöl hindurch in Paraffin ein, klebt die Schnitte auf dem Objektträger mit Mayers Eiweiss fest, färbt nach Wunsch und hebt die Präparate in Balsam oder Dammarharz auf. So oder wenigstens nahezu so verfahren jetzt viele der besseren Praktiker, und ich kenne keine Methode, die mehr Ansprüche darauf zu haben scheint, für allgemeine morphologische Forschungen als mustergültig zu gelten.

Immerhin empfehle ich dem Anfänger jenes einfachere Verfahren, wie ich es in der 1. Auflage angab, auch jetzt noch, da es ihm rasch einen Ueberblick über Form und Lage der Hauptbestandtheile seines Objektes verschafft.

7. Präparation von ganzen Objekten oder von Material, das nicht geschnitten werden soll. Die Behandlung dieser Objekte ist genau so, wie oben angegeben, mit Ausnahme der Sätze, die sich auf das Einbetten beziehen. In der Regel wird man sie also fixiren, auswaschen, färben, gradatim in Alkohol entwässern und in Balsam bringen. Diese Methode wird gewöhnlich den sogenannten nassen vorgezogen, und zwar nicht nur aus den in § 2 angeführten Gründen, sondern auch aus anderen, z. B. weil die Objekte in einem so stark lichtbrechenden Medium wie dem Balsam durchsichtiger werden.

Bei der Behandlung ganzer Objekte oder von Geweben, die durch eine nur schwer von Flüssigkeiten durchdringbare Haut geschützt sind, sind besonders zu vermeiden 1. Quellungen durch Endosmose bei der Ueberführung der Objekte von einer Flüssigkeit in eine andere weniger dichte, 2. Schrumpfung durch Exosmose beim umgekehrten Vorgange. Dies ist ganz besonders bei der Uebertragung vom stärksten Alkohol in das Vorharz zu beachten. Wenn es angeht, so mache man in die Haut einen Schnitt, sodass beide Flüssigkeiten sich direkt mischen können; jedenfalls aber sorge man für langsamen Uebergang, indem man das Vorharz unter den Alkohol bringt (§ 4). Man verwende ferner stets Flüssigkeiten, die leicht eindringen. So sind denn zum Fixiren Pikrinschwefelsäure oder

alkoholische Sublimatlösung (§ 61) zu benutzen, ferner zum Auswaschen direkt Alkohol von zunehmender Stärke, und Wasser nur dann, wenn man mit Osmiumsäure oder Chromgemischen oder ähnlichen Mitteln fixirt hat, wo das Auswaschen mit Wasser durchaus nöthig ist. Ebenso färbe man lieber mit alkoholischen Tinkturen, wie Boraxkarmin, Parakarmin, Hämacalcium etc. Theerfarben sind hier nur wenig angebracht, und wässerige Farblösungen im Allgemeinen auch seltener anwendbar, obwohl sie manchmal zulässig und mitunter sogar vorzuziehen sind.

8. Präpariren kleiner Objekte mit Nadeln. Feine Dissectionen kleiner ganzer Thiere oder Organe unter dem Präparirmikroskope nimmt man am besten auf dem Objektträger in einem Tropfen des Vorharzes vor. Hierzu eignet sich besonders Cedernöl, denn es giebt den Geweben eine dafür sehr günstige Konsistenz und verleiht durch seine Zähigkeit zarten Membranen eine gewisse Stütze. In Nelkenöl werden die Objekte nach einiger Zeit sehr brüchig; allerdings ist das mitunter gerade für das Präpariren ein Vortheil. Ferner fliesst das Nelkenöl nicht leicht über den Objektträger hin, sondern bildet gerne Tropfen, und auch diese Eigenschaft ist oft bei feineren Präparationen sehr erwünscht.

9. Allgemeines. In den früheren Auflagen habe ich nach Paul Mayer mehr zur Verwendung von alkoholischen als von wässerigen Färbmitteln für ganze Objekte gerathen und folgende Gründe dafür angegeben. Da meist die Behandlung mit Alkohol einen Theil der Fixirung ausmacht, so sind natürlich alkoholische Färbmittel angebracht, da man so die üblen Folgen vermeidet, die das Uebertragen zarter Objekte von Alkohol in Wasser nach sich zieht, nämlich die starken Diffusionsströme, die zuweilen ganze Haufen von Zellen loslösen, ferner die Quellungen in den Geweben, endlich bei dem meist langen Aufenthalt der Objekte in den wässerigen Färbmitteln ihre Maceration. Die alkoholischen Tinkturen gewähren auch noch den Vortheil, dass sie im Allgemeinen leichter eindringen, dass fast nur sie durch Chitin gehen, und dass man die Objekte tagelang ohne Gefahr in ihnen lassen kann.

Für Objekte mit schwer durchdringbarer Hülle, die in toto behandelt werden sollen, ist dies sicherlich auch jetzt noch richtig. Denn sie müssen mit einem leicht eindringenden, aber nicht permanent härtenden Mittel, z. B. Pikrinsäure, fixirt und müssen mit Alkohol ausgewaschen werden; und für solche Gewebe ist es eine gute Maxime, sie nicht wieder in Wasser zurückzubringen, wenn das irgendwie vermieden werden kann. Hat man sie hingegen mit einem stark und permanent coagulirenden Mittel, wie Chromsäure, gut fixirt, so ist diese Vorsicht viel weniger nöthig. Schnitte von Geweben, die 24 Stunden lang mit Flemmings Gemisch fixirt worden sind, können relativ unbeschädigt von absolutem Alkohol in ein wässeriges Färbbad und dann wieder direkt in jenen gebracht werden. Und gerade diese gute Eigenschaft der Chromgemische

veranlasst mich zur Empfehlung der Schnittfärbung an Stelle der Stückfärbung. Ferner sind auch qualitativ die wässerigen Färbgemische in der Regel am besten: kein alkoholisches Karmin- oder Hämatoxylingemisch z. B. wird so scharf und doch zart färben wie Alaunkarmin oder Hämalaun. Neuerdings giebt auch Mayer selbst zu, in seiner Vorliebe für alkoholische Tinkturen etwas kühler geworden zu sein.

Eine gute Auseinandersetzung der oben erwähnten Prinzipien giebt Paul Mayer in den Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. 1881 p. 1 ff. (Im Auszuge im Journ. R. Micr. Soc. London (2) Vol. 2 1882 p. 866—881 und im Amer. Natural. Vol. 16 1882 p. 697—706; in beiden sind einige Verbesserungen enthalten, die im Original fehlen).

2. Kapitel.

Tödten.

10. In der Regel besteht der erste Schritt zur Präparation eines Organs oder eines ganzen Thieres darin, dass man es so rasch und vollständig wie möglich der Wirkung eines **Fixirmittels** (s. Kapitel 3) aussetzt. Das Organ oder Thier muss also noch leben und in normaler Beschaffenheit sein, und das Fixirmittel soll nun mit ausreichender Geschwindigkeit zugleich den Organismus und seine histologischen Elemente tödten.

Indessen lässt sich diese Methode durchaus nicht immer anwenden. Viele Thiere nämlich, besonders die weichen und skeletlosen, aber sehr kontraktilen, wie manche Cölenteraten, Bryozoen, Serpuliden etc., kontrahiren sich bei solcher Behandlung heftig, ziehen ihre Tentakel oder Kiemen ein und sterben in einem Zustande, der sie zu wahren Karikaturen macht. In solchen Fällen muss man zu besonderen Methoden greifen.

Plötzliches Tödten.

11. Hitze. Im Allgemeinen lassen sich die erwähnten schwierigen Fälle auf zwei Weisen behandeln: man tödtet das Thier plötzlich, sodass es sich nicht mehr zusammenziehen kann, oder man lähmt es zuvor durch Narcotica.

Zum plötzlichen Tödten ist Hitze sehr gut. Sie erlaubt hinterher eine gute Färbung und hindert auch weniger als irgend eine andere Methode die Prüfung der Gewebe mit chemischen Reagentien. Auch fixirt sie die Gewebe, während sie den Organismus tödtet. Die Schwierigkeit besteht nur darin, genau die richtige Temperatur zu treffen, die natürlich nach den Objekten verschieden ist. Gewöhnlich reichen 80—90° C. wohl völlig aus, und sehr oft wird man nicht über 60° zu gehen brauchen. In der Regel genügen einige Sekunden des Verweilens in solcher Temperatur.

Kleine Objekte (Protozoen, Hydroiden. Bryozoen) bringt man mit einem Tropfen Wasser in ein Uhrglas oder auf einen Objektträger und erhitzt sie über einer Spiritusflamme. Bei grösseren Objekten erhitzt man das Wasser oder das Fixirmittel für sich und wirft die Thiere dann hinein.

Sobald man annehmen darf, dass das Protoplasma der Gewebe durch und durch coagulirt ist, muss man die Objekte, falls man sie in Wasser getödtet hat, in 30—70%igen Alkohol bringen.

Ausgezeichnete Dienste beim Konserviren vieler Seethiere leistet das Tödten mit heissem Süsswasser. Einige grosse Nemertinen werden so besser konservirt als nach allen andern mir bekannten Methoden.

12. Langsam kontraktile Thiere. Thiere, die sich nur langsam kontrahiren, z. B. *Alcyonium* und *Veretillum*, ferner einige Tunikaten, wie *Pyrosoma*, tödtet man mit Vortheil so, dass man sie in eine sehr rasch fixirende Flüssigkeit wirft, die je nachdem kalt oder heiss angewandt wird. Vorzüglich ist hierzu Eisessig oder wenigstens sehr starke Essigsäure (van Beneden), so z. B. für manche Medusen. Je nach der Grösse der Thiere lässt man sie einige Sekunden oder Minuten darin und bringt sie dann in Alkohol von wenigstens 50% (s. § 71 und 821). Recht gute Resultate bei kleinen Anneliden und Hirudineen hat mir Citronensaft gegeben, auch Sublimat wirkt vorzüglich.

Betäuben.

13. Das ganze Geheimniss bei der Betäubung besteht darin, dass die Narcotica sehr allmählich und in sehr kleinen Dosen dem Wasser zugesetzt werden, worin die Thiere sind, und dass man ihre Wirkung mit Geduld abwartet.

Lo Bianco (Jena. Zeit. Naturw. 13. Bd. 1879 p. 467; Mitth. Z. Stat. Neapel 9. Bd. 1890 p. 449) narkotisirt die Aktinie *Adamsia* mit Tabakrauch. Das Gefäss mit den Thieren kommt unter eine Glasglocke, und eine gebogene Glasröhre oder ein Gummischlauch führt von aussen unter der Glocke durch in das Wasser. Nun bläst man durch Röhre oder Schlauch eine Zeit lang Tabakrauch in das Wasser und überlässt dann die Thiere 3 Stunden lang sich selbst. Darauf räuchert man wieder, lässt sie über Nacht ruhig stehen und versucht am nächsten Morgen mit einer Nadel, ob die Tentakel noch reizbar sind; sobald nun diese auf den Stich nicht mehr reagiren, darf man die Betäubung als stark genug erachten. Man vollendet sie mit etwas Chloroform und giesst zuletzt die Fixirflüssigkeit in so reichlicher Menge hinzu, dass die Thiere sterben, bevor sie sich kontrahiren können.

14. Nikotinlösung lässt sich statt des Tabakrauches verwenden. Andres (Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. 1880 p. 123) bringt die Aktinie

Edwardsia zur Betäubung in eine Schale mit $^{1}/_{2}$ Liter Seewasser und setzt von einer schwachen Nikotinlösung ganz langsam so viel zu, dass in 12 Stunden etwa 1 g Nikotin auf das Thier eingewirkt hat.

15. Chloroform kann man entweder direkt oder als Dampf brauchen. Korotneff (Mitth. Z. Stat. Neapel 5. Bd. 1884 p. 233) lässt Siphonophoren sich erst in Seewasser ausstrecken, bringt dann Chloroform in einem Uhrglase auf dem Wasser zum Schwimmen und deckt eine Glasglocke darüber. Sobald die Thiere unempfindlich geworden sind, werden sie mit reichlichen Mengen von heisser Sublimat- oder von Chromsäurelösung getödtet. — Das **flüssige Chloroform** spritzt man in kleinen Mengen auf das Wasser mit den Thieren, am besten mit einer ganz feinen Spritze oder Pipette, sodass es ordentlich zerstäubt. Man muss aber jedesmal nur wenig nehmen und alle 5 Minuten die Dosis wiederholen, bis die Thiere betäubt sind. Ich selber habe auf diese Weise grosse Medusen in 1—3 Stunden ausgestreckt und völlig betäubt gefunden. Nach Andres schlägt das Mittel bei Aktinien nicht an, da ihre Gewebe schon vorher maceriren. — Preyer (Mitth. Z. Stat. Neapel 7. Bd. 1886 p. 27) empfiehlt Chloroformwasser zur „Herbeiführung allgemeiner Ruhe“ der Seesterne.

16. Aether oder **Alkohol** lassen sich ebenso anwenden. Andres hat bei Aktinien gute Resultate mit dem von Lo Bianco erfundenen Gemisch aus 1 Theil Glycerin, 2 Theilen Alkohol von 70 % und 2 Theilen Seewasser erhalten. Man giesst es sorgfältig auf das Wasser mit den Thieren und lässt es ruhig in die Tiefe diffundiren. Mitunter dauert das mehrere Stunden. Eisig (Fauna Flora Golf. Neapel 16. Monogr. 1887 p. 293) betäubt die Capitelliden durch Einlegen in ein Gemisch von 1 Theil Alkohol von 70 % und 9 Theilen Seewasser und rühmt diese Methode ungemein zur Untersuchung der lebenden Thiere, die jederzeit durch Zurückbringen in reines Seewasser wieder munter werden. Cori (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1890 p. 438) findet aber nach Betäubung mit 10 %igem Alkohol die Mitosen schlecht konservirt, empfiehlt dagegen besonders den

17. Methylalkohol, der von allen Alkoholen die Eiweissstoffe am wenigsten angreife. Er verwendet ihn zur Betäubung von allerlei Thieren je nach deren Medium entweder mit dem 9 fachen an Seewasser oder mit dem 9 fachen an Salzwasser (für Süsswasserthiere: auf 90 ccm Wasser 0,6 g Kochsalz, um die Maceration zu verhüten)

verdünnt; auch kann man einige Tropfen Chloroform beifügen (so für *Cristatella*; s. Zeit. Wiss. Z. 55. Bd. 1893 p. 626).

18. Chloralhydrat, wohl zuerst von Foettinger (Arch. Biol. Tome 6 1885 p. 115) empfohlen, ist für einige Objekte sehr gut. F. wirft Kristalle davon in das Wasser zu den Thieren; für *Alcyonella* nimmt er 0,25—0,80 g Chloralhydrat auf 100 g Wasser, und es dauert dann etwa $^3/_4$ Stunden, bevor die Thiere so betäubt sind, dass man sie ausgestreckt fixiren kann. Er hat günstige Resultate mit marinen und anderen Bryozoen, mit Anneliden, Mollusken, Nemertinen, Aktinien und *Asteracanthion* erhalten, jedoch nicht mit Hydroiden.

Lo Bianco (Mitth. Z. Stat. Neapel 9. Bd. 1890 p. 442) verwendet für allerlei niedere Seethiere frisch bereitete Lösungen davon in Seewasser ($^1/_{10}$—$^1/_5$ %); er hält es für unschädlich, da die Thiere, nach einiger Zeit in reines Wasser gebracht, wieder ganz munter werden.

Verworn (Zeit. Wiss. Z. 46. Bd. 1887 p. 99) bringt Süsswasser-Bryozoen (*Cristatella*) auf einige Minuten in eine 10%ige Lösung von Chloralhydrat, worin sie sich bald ausstrecken. — Kükenthal (Jena. Zeit. Naturw. 20. Bd. 1887 p. 511) hat mit einer Lösung von 1 Th. Chloralhydrat auf 1000 Th. Seewasser an einigen Anneliden gute Erfahrungen gemacht.

Die Methode mit Chloralhydrat macerirt nach Cori (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1890 p. 438) manche Objekte.

19. Cocaïn gibt nach Richard (Z. Anzeiger 8. Jahrg. 1885 p. 332) gute Resultate. Er bringt Bryozoen in ein Uhrglas mit 5 ccm Wasser und setzt allmählich $^1/_2$ ccm einer 1%igen Lösung von Cocaïn in Wasser hinzu. Nach 5 Minuten sind die Thiere schon etwas betäubt; nun wird noch $^1/_2$ ccm der Lösung hinzugesetzt, aber dann muss man die Tentakel schon stark reizen, um sie sich kontrahiren zu sehen, und noch 10 Minuten später sind die Thiere völlig ausgestreckt und todt.

Diese Methode soll für Bryozoen, *Hydra* und einige Würmer Erfolg haben. Für Rotatorien ist sie nach Rousselet die beste. Auch für *Aplysia* ist sie empfohlen worden (§ 824).

Cori (s. oben) macht darauf aufmerksam, dass Fixirmittel, wie Sublimat, leider das Cocaïn als weisses Pulver ausfällen. S. jedoch § 624 (Eisig).

20. Hydroxylamin. Dies hat Hofer (Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 318) mit Erfolg bei den verschiedensten Thieren angewandt. Man nimmt entweder das Sulfat oder besser das Chlorhydrat. Letzteres ist

allerdings im Handel gewöhnlich mit Salzsäure verunreinigt; man löst es daher in Wasser (See- oder Süsswasser, je nach den Objekten, aber ja nicht destill. Wasser) und neutralisirt sorgfältig mit Soda. Die Lösung mag 1 %ig sein, wird aber beim Gebrauch verdünnt. Man bringt die Thiere in die Lösung, entweder von $^{1}/_{10}$ % auf 30 Minuten oder weniger (Infusorien), oder von $^{1}/_{4}$ % auf 15 Minuten bis 1 Stunde (*Hydra*), oder nimmt sie direkt 1 %ig auf $^{1}/_{2}$—2 Stunden (*Hirudo*) oder sogar auf 10—20 Stunden (*Helix* und *Anodonta*).

Hydroxylamin ist ein äusserst stark reduzirendes Mittel. Man darf daher die betäubten Thiere nicht mit Fixirmitteln behandeln, die (wie Osmiumsäure, Chromsäure, Sublimat, Gold- oder Platinchlorid) leicht reduzirbar sind, es sei denn, man habe vorher das Hydroxylamin tüchtig durch Wasser ausgewaschen.

21. Mit **Chlormagnesium** hat Tullberg (Arch. Z. Expér. (2) Tome 10 1892 p. 11) einigen Erfolg gehabt. Für Aktinien setzt man eine 33 %ige Lösung ganz langsam dem Wasser mit den Thieren zu, bis das Gefäss 1 % des Salzes enthält (also zu 1 Liter Seewasser braucht man 33 ccm Lösung); in $^{1}/_{2}$ Stunde muss das geschehen sein. Nach einer weiteren halben Stunde ist das Thier narkotisirt und kann fixirt werden. Für Land- und Süsswasser-Evertebraten muss man stärkere Lösungen nehmen. — Redenbaugh (Amer. Natural. Vol. 29 1895 p. 399; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1895 p. 385) ist mit **Magnesiumsulfat** erfolgreich gewesen: entweder giebt er es in fester Form zu dem Seewasser mit den Thieren, bis dieses damit gesättigt ist, oder bringt die Thiere (Anneliden) in eine gesättigte Lösung.

22. Vergiften mit kleinen Dosen irgend eines Fixirmittels hilft auch zuweilen. So giesst Lo Bianco (Mitth. Z. Stat. Neapel 9. Bd. 1890 p. 471), um *Ascidia* und *Rhopalaea* ausgestreckt zu konserviren, von einer 1 %igen Chromsäure etwas auf die Oberfläche des Wassers, worin die Thiere sind, und lässt die Säure langsam nach unten diffundiren. Das nimmt 12—24 Stunden in Anspruch. Aehnlich tödtet er *Ciona* mit seiner Chromessigsäure No. 2 (§ 43). Auch Osmiumsäure oder Pikrinschwefelsäure lässt sich mitunter ebenso verwenden. Ich selbst habe Medusen in befriedigender Weise dadurch konserviren sehen, dass Kristalle von Sublimat dem Seewasser zugesetzt wurden.

Morphium, Curare, Strychnin, Blausäure und andere lähmende Mittel haben ebenfalls Verwendung gefunden.

23. Ersticken lässt sich zuweilen mit Erfolg versuchen. Landschnecken tödtet man zur Präparation der Organe, indem man sie in ein Gefäss voll ausgekochtes, also luftfreies Wasser bringt und dieses dicht schliesst. Nach 12—24 Stunden sind die Thiere gewöhnlich todt und ausgestreckt. Giebt man in das Wasser etwas Tabak, so geht es rascher. Zuweilen genügt es auch, wenn man Wasserthiere einfach

den Sauerstoff des Wassers verbrauchen lässt; so ist es mir hie und da mit Holothurien und anderen Echinodermen geglückt, Ward (Amer. Natural. Vol. 25 1891 p. 398) mit Hydroiden, Aktinien und anderen Thieren, und Uexküll (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p. 463) mit Seeigeln. Waren die Thiere beim Beginn der Narkose nicht gut ausgestreckt gewesen, so möge man sie auf kurze Zeit in reines Seewasser zurückbringen, und sobald sie sich darin ausgestreckt haben, muss man sie sofort in ein rasch tödtendes Fixirmittel werfen.

Seethiere tödtet man mitunter in befriedigender Weise, indem man sie in Süsswasser bringt. **Warmes Wasser** (§ 11) ist oft gut zum Lähmen und sogar zum Tödten von Seethieren und Süsswasserthieren.

24. Kohlensäure ist von Fol (Z. Anzeiger 5. Jahrg. 1882 p. 698) empfohlen worden. Man soll das Wasser, worin die Thiere liegen, damit sättigen und wird bei den meisten Echinodermen und Cölenteraten Erfolg haben, nicht aber bei Mollusken oder Fischen. Mir hat es bei kleinen Anneliden und Hirudineen ganz vortreffliche Dienste geleistet. Man braucht aber durchaus keinen besonderen Gasapparat dazu, sondern kann einfach eine Flasche Sodawasser in das Wasser mit den Thieren schütten. Allerdings werden nur ganz kleine rasch betäubt, z. B. *Stylaria proboscidea* in einigen Sekunden, während eine kleine *Nephelis* 5 Minuten und eine grosse schon ebenso viele Stunden braucht. Die betäubten Thiere erholen sich übrigens rasch wieder, wenn man sie in reines Wasser legt. Uexküll (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p. 463) hat Seeigel durch Kohlensäure ungemein rasch gelähmt, ebenso einen kleinen Knochenfisch, während *Scyllium* und Krebse viel länger widerstanden und eine Muschel gar nicht afficirt wurde.

25. Wasserstoffhyperoxyd. Volk (Z. Anzeiger 19. Bd. 1896 p. 294) tödtet Rotatorien mit verdünntem Wasserstoffhyperoxyd (1—2 Tropfen der 3%igen Lösung auf 1 ccm Wasser). Die Thiere sterben, wenn die Verdünnung richtig getroffen ist, ausgestreckt; man bringt sie gleich nach dem Tode in Wasser und von da in ein Fixirmittel.

3. Kapitel.

Fixiren und Härten.

26. Nothwendigkeit des Fixirens. Oben ist bereits (§ 2) auseinandergesetzt worden, was Fixiren heisst. Hier soll nur auf der absoluten Nothwendigkeit des Fixirens bestanden und diese an einem Beispiel kurz erläutert werden. Legt man ein Stückchen frische Retina in Humor aqueus, Serum oder eine andere sogenannte indifferente Flüssigkeit oder auch direkt in eins von den Mitteln, die zum Aufbewahren der Präparate dienen, so wird man bald gewahr, dass die Stäbchen und Zapfen ihr Aussehen wie im Leben nur ganz kurz behalten; schon nach einigen Minuten treten Veränderungen auf: ihre Aussensegmente zerfallen in Scheiben und werden zuletzt ganz unkenntlich, wenn nicht gar völlig zerstört. In derselben kurzen Zeit werden die Nervenfasern varicös und scheinen dicht mit Knötchen besetzt zu sein; auch andere postmortale Veränderungen treten gar schnell ein. Bringt man dagegen die Retina in eine starke Lösung von Osmiumsäure, so sind auch nach 24 Stunden noch die Stäbchen und Zapfen völlig erhalten und die Nervenfasern nicht varicös geworden. Ja, nach dieser vorläufigen Härtung kann man die Retina mit Wasser behandeln (eine frische Retina würde das absolut nicht vertragen), sogar Tage lang darin lassen; man darf sie färben, ansäuern, härten, einbetten, schneiden und in wässerige oder harzige Media einschliessen, und alles dies, ohne ihr zu schaden.

27. Die Wirkung der Fixirmittel beruht entweder bloss darauf, dass sie den Geweben Wasser entziehen — dies thut z. B. der Alkohol — oder darauf, dass sie mit gewissen Bestandtheilen derselben chemische Verbindungen eingehen. Von diesen sind manche allerdings wenig stabil und werden bereits beim Auswaschen wieder zerlegt — so z. B. lässt sich die Pikrinsäure aus den Geweben durch einfaches Behandeln mit Wasser und Alkohol ganz wieder entfernen —, manche hingegen

sehr dauerhaft. Im letzteren Falle scheinen meist, wenn nicht immer, die Eiweissstoffe in den Geweben die Reagentien zu reduziren und dann mit ihnen eine feste chemische Verbindung einzugehen; dies gilt unter anderen von der Osmiumsäure, der Chromsäure und ihren Salzen sowie von den Salzen der schweren Metalle, wie Quecksilber, Eisen, Platin, Gold, Silber. Leider ist hierüber chemisch noch Nichts wirklich genau bekannt. Für die Praxis des Histologen steht jedoch so viel fest, dass die letzteren Mittel, da sie sich mit den Geweben mehr oder weniger innig vereinigen, diesen auch, abgesehen vom blossen Fixiren, Eigenschaften ertheilen, die für die weiteren Operationen meist nützlich sind. Nämlich 1. werden durch die Einlagerung anorganischer Bestandtheile die Gewebe hart und widerstehen daher dem späteren Entwässern durch den Alkohol und dem Einbetten in Paraffin weit besser, als wenn sie nicht gehärtet werden; 2. treten gleichzeitig in vielen Fällen manche histologischen Elemente, indem sie die Reagentien anders an sich binden, als die übrigen, für das Auge besser hervor: sie werden, wie man das nennt, differenzirt, auch ohne zu diesem Zweck erst besonders mit Farbstoffen behandelt zu sein; 3. bilden manche Chemikalien mit gewissen Stoffen in den Geweben chemische Verbindungen, die das Zustandekommen mancher wichtigen Färbungen überhaupt erst ermöglichen und daher in diesem Falle als sogenannte Beizen wirken.

Allerdings können durch die Art der Fixirung auch Nachtheile hervorgerufen werden. So z. B. lassen sich Objekte, die mit Chromsäure (oder ihren Salzen) oder Osmiumsäure fixirt worden sind, mit Karmin und ähnlichen Farbstoffen meist nicht besonders leicht, mitunter sogar durchaus nicht färben, falls man nicht vorher die Chromverbindung wieder eigens weggeschafft hat (s. § 40); dagegen kommt man mit Hämateïnthonerde meist auch dann noch zum Ziele, und Schnitte durch solche Objekte lassen sich mit Safranin oder Eisenhämatoxylin ganz gut tingiren. Fixirt man aber mit Sublimat oder einem Pikringemisch, so kann man ganz nach Belieben färben.

Die spezielle Art der Nachbehandlung ist weiter unten bei jedem Fixirmittel genau angegeben.

28. Wahl der Fixirmittel. Rathschläge bei der Wahl der Fixirmittel für die verschiedenen Gewebe und Organe der Thiere finden sich in den Kapiteln 24—32 dieses Buches. Hier sollen nur einige allgemeine Punkte erörtert werden.

Die hauptsächlichsten Mittel, wie sie in der Regel gebraucht

werden, sind Flemmings Gemische, Hermanns Platinchlorid-Gemisch und die Sublimatlösungen.

Flemmings Gemische sollten, wo es nur eben angeht, stets gebraucht werden, denn ich halte sie im Allgemeinen bei Weitem für die besten Mittel, mit Ausnahme von Hermanns Gemisch, das aber leider bei Anwendung in grossen Mengen zu theuer wird. Aber sie lassen sich nicht immer verwenden; ihre Wirkung in die Tiefe zum Beispiel lässt sie für schwer durchdringliche Objekte, wie sie bei den Arthropoden so häufig sind, ganz ungeeignet erscheinen.

Für sehr kleine Objekte, etwa solche, die in toto eingeschlossen werden können, ist Osmiumsäure fast eben so gut wie Flemmings Gemische. Sind die Objekte grösser, oder handelt es sich um Embryonen, die in toto gefärbt werden sollen, so kann Sublimat empfohlen werden. Im Allgemeinen scheint dieses mir die gröberen Formen sehr getreu zu konserviren und den Gemischen von Flemming oder Hermann nur darin nachzustehen, dass es nicht so feine optische Differenzirungen liefert.

Der **Anfänger** halte sich jedenfalls an das Sublimat, so weit es irgend geht, da er dann viel weniger oft auf Schwierigkeiten stossen wird als bei den anderen Fixirmitteln.

29. Praktische Winke und Maassregeln für das Fixiren. In erster Linie achte man darauf, dass die Gewebe beim Fixiren unbedingt lebensfrisch sind, sonst fixirt man nur postmortale oder krankhafte Zustände. Ferner sorge man ja für rasches Eindringen des Fixirmittels: man schneide die Objekte in so kleine Stücke, wie das überhaupt für die sonstigen Zwecke angeht; muss man aber Organe oder Thiere in toto konserviren, so mache man vorher möglichst grosse Oeffnungen hinein.

Das Eindringen der Reagentien wird durch Hitze sehr erleichtert. Entweder also erwärme man die Flüssigkeit vorher und stelle sie dann mit den Objekten in das Wasserbad für das Paraffin, oder man wende sie geradezu siedend heiss an, z. B. kochende Sublimatlösung für gewisse Korallen und Hydroiden, oder kochenden Alkohol absolutus für Arthropoden mit sehr dicker Haut.

Die Menge des Fixirmittels muss die Objekte an Volumen ganz beträchtlich übertreffen. Geschieht das nicht, so kann sich seine Zusammensetzung durch das Wasser oder die löslichen Substanzen in den Geweben bedenklich ändern. So muss z. B. von einem so langsamen und schwachen Mittel wie der gesättigten wässerigen Lösung von

Pikrinsäure etwa 100 Mal mehr genommen werden, als das Volumen des Objektes beträgt, dagegen braucht man von sehr energischen Lösungen, wie den Flemmingschen, relativ geringere Mengen.

Braus & Drüner (Jena. Zeit. Naturw. 29. Bd. 1895 p. 435) konserviren Fische durch Injektion in den Bulbus aortae. Zunächst spülen sie von ihm aus die Adern mit Normalsalzwasser aus, injiziren dann das Fixirmittel, bis „alle sichtbaren Theile die mit der Wirkung des Fixirmittels verbundene Farbenänderung zeigen“, verdrängen es wieder durch Wasser, dieses durch Alkohol und legen das Thier in Alkohol. Nach Injektion von Chromgemischen bringt man den Fisch meist sofort in Müllers Gemisch. Für einen grossen Rochen von $1^1/_2$ m Länge und 1 m Breite braucht man nur 3 Liter Normalsalzwasser, 4 Liter Sublimatessigsäure (5:5:100), 4 Liter Wasser und 6—8 Liter Alkohol. Die Leber wird ihres vielen Fettes halber nach der Injektion zum grössten Theile entfernt. Die Konservirung ist überall gleichmässig und genügt auch für genaue histologische Untersuchungen. — Mann (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 479) injizirt, um das Gehirn möglichst rasch durch und durch zu fixiren, Säugethieren zuerst nur 20 Sekunden lang warmes (39° C.) Normalsalzwasser (0.75 %), dann gleich hinterher warme Sublimatlösung (nach Heidenhain, § 61) etwa 5 Minuten lang, präparirt es heraus und legt es auf 12 Stunden in die gleiche Lösung. Auswaschen direkt mit Alkohol von 50 %, der mehrere Male gewechselt wird, dann mit solchem von 80 %, 90 % und 100 %. Die Retina behandelt er ähnlich, lässt sie aber nur 2 Stunden im Sublimat. S. auch § 677.

Im Allgemeinen lasse man die Fixirmittel nicht länger einwirken, als bis sie das geleistet haben, was man von ihnen verlangt. Sublimatlösung z. B. macht schon bald die Objekte brüchig. Einzelne Forscher lassen allerdings Flemmings Gemische oft mehrere Wochen lang wirken, und dies scheint fast zur Erzielung gewisser optischer Differenzirungen nöthig zu sein.

Zum Auswaschen nach dem Fixiren verwende man ja die richtige Flüssigkeit. Oft ist es nämlich gar nicht einerlei, ob man Alkohol oder Wasser nimmt: zuweilen macht letzteres die ganze Fixation zu nichte (so bei Pikrinsäure), zuweilen fällt ersterer Substanzen aus, die die Präparate beschädigen können. Näheres hierüber bei den einzelnen Fixirmitteln!

Die Waschflüssigkeit muss reichlich sein. Man wechsele sie,

falls sie trübe wird. Auch das Waschen erleichtert Wärme oft; z. B. löst Alkohol von 40° C. etwa doppelt so viel Pikrinsäure wie bei gewöhnlicher Temperatur (Fol).

30. Fixiren von Seethieren. Als Regel gelte im Allgemeinen, dass die Gewebe von Seethieren den Reagentien mehr Widerstand leisten als die der verwandten Süsswasser- oder Landthiere. Daher müssen die Fixirmittel stärker sein (nach Langerhans etwa 2—3 mal).

Man muss von den Seethieren das Wasser so gut wie möglich ablaufen lassen, wenn man sie in Alkohol oder sonst ein Fixirmittel bringt, das die Seesalze niederschlagen kann. Thut man das nicht, so bilden diese Salze auf den Objekten eine Kruste, die den Reagentien den Weg nach innen versperrt, sodass Maceration eintreten kann und später auch die Tinktion schlechter von Statten geht. Daher sollten die Fixirmittel so gewählt werden, dass sie die Seesalze in Lösung halten und schliesslich ganz wegschaffen. Jedenfalls sollten sie nie mit Seewasser gemacht werden, wie einige Forscher unbedacht vorgeschlagen haben.[1]) Nimmt man Alkohol, so muss er mit Salzsäure oder sonst einer brauchbaren Säure angesäuert werden. Obige Bedingungen erfüllt Pikrinsalpetersäure. (Vergl. hierüber Paul Mayer in: Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. 1881 p. 1 ff.; im Auszug in: Journ. R. Micr. Soc. London (2) Vol. 2 1882 p. 866 ff. und in: Amer. Natural. Vol. 16 1882 p. 697 ff.).

31. Nothwendigkeit des Härtens. Die Einbettmethoden sind zu einer solchen Vollendung gediehen, dass die sorgfältige Härtung weicher Gewebe, wie sie früher zur Herstellung feiner Schnitte unbedingt nöthig war, jetzt allermeist es nicht mehr ist. Denn vorsichtiges Durchtränken mit Paraffin oder anderen brauchbaren Massen ermöglicht es, auch die weichsten Objekte gut zu schneiden, ohne dass man sie vorher stärker zu härten brauchte, als es der Alkohol schon von selbst besorgt, den man zur Entwässerung der Objekte nach dem Fixiren so wie so anwenden muss. Aber es giebt da einige Ausnahmen. So z. B., wenn man so grosse Schnitte zu machen hat wie durch das

---

[1]) In dieser scharfen Form lässt sich der Satz doch nicht aufrecht erhalten. Wenn z. B. nämlich, wie es für Seepflanzen durch die Versuche von Berthold feststeht und auch für manche Seethiere der Fall zu sein scheint, die Lösung der Osmiumsäure in Seewasser viel besser fixirt als die in Süsswasser, so muss man sie doch anwenden; hinterher kann man ja die Seesalze durch Auswaschen entfernen, oder man schliesst das Objekt in Glycerin ein. [M.]

menschliche Hirn: dieses lässt sich doch nicht mit Alkohol in einigen Stunden ordentlich durchtränken, noch weniger aber mit Paraffin oder irgend einer anderen Masse. Ferner erfordern Organe, die entweder äusserst zart oder unzugänglich sind, wie die Retina oder die Schnecke im Ohr, unbedingt eine spezielle Härtung, sonst geben sie keine wirklich guten Resultate. (Genaueres hierüber bei den einzelnen Organen.)

32. Praktische Winke und Maassregeln für das Härten. Man nehme im Allgemeinen relativ viel Flüssigkeit und wechsele sie oft. Die richtige Menge muss man für jedes Objekt und jedes Härtmittel erst ausprobiren. Ist die Flüssigkeit nicht reichlich genug, so ändert sie sich zweifellos schon bald bedenklich dadurch, dass aus den Objekten die löslichen Substanzen hineindiffundiren, und dann kommt es am Ende leicht statt zur Härtung zur Maceration. Sobald ferner in Folge der Diffusion die Flüssigkeit soviel Colloide und Krystalloide aus den Objekten aufgenommen hat, dass sie davon ebensoviel enthält wie die Objekte selber, so ist das osmotische Gleichgewicht erreicht, und die Diffusion hört auf. Das heisst also: die Flüssigkeit dringt nicht weiter ein, und daraus ergiebt sich im Inneren Maceration. Auf der anderen Seite scheint eine geringe Menge von Colloiden im Härtgemisch der gewünschten Reaktion förderlich zu werden, insofern sie die Gewebe vor dem Brüchigwerden bewahrt und ihnen so eine bessere Konsistenz verleiht. Aus alledem ergiebt sich der Nutzen einer gewissen Proportion im Volumen des Härtgemisches zu dem des Objekts.

Man härtet am besten in hohen Cylindern und hängt die Objekte mit einem Faden oben in der Flüssigkeit auf. So hat die Diffusion möglichst freies Spiel, und die etwaigen Präcipitate fallen harmlos zu Boden.

Man härte im Anfang stets mit einer schwachen Lösung und verstärke sie allmählich erst, wenn die Gewebe schon konsistent genug geworden sind, um auch ein energisches Reagens zu vertragen.

Sobald die Objekte die gewünschte Härte erlangt haben, müssen sie gleich herausgenommen werden.

Was die Wahl des Härtmittels angeht, so nehme man Chromsäure, wem es vor Allem auf rasche und energische Wirkung ankommt. Soll aber die Wirkung mässiger und gleichmässiger sein, so ist ein Chromsalz oder eins von den Gemischen, worin Chromsalze oder Platinchlorid die Hauptsache sind, zu empfehlen.

4. Kapitel.

Fixirmittel.

A. Osmiumsäure, Chromsäure, Salpetersäure, Chromate, Sulfate, schweflige Säure.

33. Osmiumsäure. Das Osmiumtetroxyd ($Os O_4$) wird gewöhnlich als Osmiumsäure oder Ueberosmiumsäure bezeichnet, obwohl es keine sauren Eigenschaften besitzt. Es lässt sich nur äusserst schwer lange gebrauchfähig aufbewahren, denn es ist ungemein flüchtig und wird in wässeriger Lösung bei Gegenwart von Spuren organischer Substanz mit grosser Schnelligkeit theilweise reduzirt. Gewöhnlich glaubt man, das Licht allein bewirke dies, aber das ist nicht richtig: man kann die wässerige Lösung dem Licht ungestraft aussetzen, falls nur der Zutritt von Staub absolut verhindert wird. Ja, es sieht beinahe so aus, als würde die Lösung für gewisse Zwecke im Licht besser, ähnlich wie das Goldchlorid. (Wie mir Dr. Lindsay Johnson mittheilt, scheinen seine Beobachtungen darauf hinzudeuten, dass bei gänzlichem Schutz vor Staub die Lösungen sich besser im Licht halten als im Dunkeln, wenn man sie gelegentlich der Sonne aussetzt.)

Die Autoren legen viel Gewicht darauf, dass die Dämpfe der Osmiumsäure die Schleimhäute stark reizen. Man bekomme ungemein leicht einen ernsten Katarrh, Reizung der Bronchien, Laryngealkatarrh, Conjunctivitis etc. Ich habe das nie an mir verspürt, aber bei manchen Personen ist das zweifellos der Fall, und dann sollten sie sehr vorsichtig mit Osmiumsäure umgehen.

34. Aufbewahrung der Lösungen von Osmiumsäure. Ich habe sorgfältig mehrere von den angepriesenen Methoden zur Freihaltung der Lösungen von Staub probirt und bin zu dem Resultate gekommen, dass man am praktischsten verfährt wie folgt: die Lösung der Osmiumsäure in Chromsäurelösung ist nicht gleich der in Wasser leicht reduzirbar, sondern lässt sich ohne besondere Vorsicht aufbewahren. Ich habe daher meinen Vorrath an Osmiumsäure als eine 2 $^0/_0$ige Lösung in 1 $^0/_0$iger Chromsäurelösung fertig dastehen und brauche ihn

so nicht nur zum Fixiren mit Osmiumdämpfen, sondern auch zur Bereitung der gebräuchlichsten Gemische, also denen von Flemming und von Hermann. Ausserdem halte ich eine kleine Menge 1 %iger Lösung in destillirtem Wasser sorgfältig vor Staub geschützt und benutze sie nur in besonderen Fällen. Wer übrigens viel mit Dämpfen fixirt, mag sich dazu direkt der festen Säure bedienen.

Grübler & Hollborn liefern jetzt Osmiumsäure auch in zugeschmolzenen Röhrchen von nur 0,1 Gramm Inhalt.

Nach Cori (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1890 p. 442) halten sich die Lösungen in destillirtem Wasser konstant, wenn man ihnen so viel Kaliumhypermanganat zusetzt, dass sie hellrosa werden. Sobald sie sich entfärben, muss man wieder ein wenig von diesem Salz zugeben, sodass sie beständig rosa bleiben.

35. Regeneration reduzirter Lösungen. Bristol (Amer. Natural. Vol. 27 1893 p. 175; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1893 p. 564) giebt an, man könne reduzirte Lösungen durch Wasserstoffhyperoxyd wieder oxydiren. Die Reaktion sei identisch mit der, wenn man allzu schwarz gewordene Gewebe mit diesem Mittel wieder bleiche. (Dabei nimmt er an, das Osmiumtetroxyd werde durch organische Substanzen zu $Os\,O_2$ reduzirt, und so würde $Os\,O_2 + 2\,H_2\,O_2 = Os\,O_4 + 2\,H_2\,O$ sein.) Zur Regeneration von 100 ccm einer 1 %igen (das Journ. R. Micr. Soc. sagt irrthümlich 10 %igen) Lösung sollen 10—20 Tropfen einer frischen Lösung von Wasserstoffhyperoxyd (wie stark diese ist, wird nicht angegeben) genügen.

Nach Kolossow (Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 40) lassen sich halb reduzirte Lösungen, solang sie noch nach Osmiumsäure riechen, durch Zusatz von etwas pulverisirtem Kalialaun wieder klar und brauchbar machen.[1])

36. Fixiren mit den Dämpfen von Osmiumsäure. Osmiumsäure wird oft als Dampf benutzt, und zwar mit Vortheil meist dann, wenn sich die Gewebe diesem direkt aussetzen lassen. Man spannt sie mit Nadeln auf einem Kork aus, der gut in eine weithalsige Flasche mit ein wenig fester Osmiumsäure (oder auch etwas 1 %iger Lösung) auf

---

[1]) In der That setzt sich dann das reduzirte Metall, das sonst in der Flüssigkeit lange schweben bleibt und sich nicht abfiltriren lässt, rasch zu Boden; ein Zusatz von Kochsalz besorgt das aber auch, und natürlich kann nicht davon die Rede sein, dass die Lösung wieder ihre alte Stärke erreiche. [M.]

dem Boden passt. Sehr kleine Objekte, wie isolirte Zellen, werden einfach auf einen Objektträger gebracht, den man dann umgedreht auf die Mündung der Flasche legt. So bleiben sie liegen, bis sie sich bräunen; isolirte Zellen sind meist in $^1/_2$ Minute gut fixirt, dagegen erfordern dichtere Objekte, z. B. die Retina, um ordentlich durchdrungen zu werden, mehrere Stunden. Gut ist es ferner, die Objekte nachher vor dem Färben mit Wasser ganz leicht abzuwaschen. Zum Färben ist Methylgrün empfehlenswerth, wenn man die Objekte gleich weiter in einem wässerigen Medium studiren will, hingegen für Dauerpräparate Alaunkarmin, Pikrokarmin oder Hämatoxylingemische.

Zum Studium der Kerne ist es nach Gilson (La Cellule Tome 1 1885 p. 96) unter Umständen nützlich, mit einem frischen Gemisch von Osmiumsäure und Ameisen- oder Essigsäure zu räuchern.

Das Fixiren mit den Dämpfen von Osmiumsäure ist, wo es überhaupt angeht, deswegen so gut, weil die Säure besser in dieser Form als in wässeriger Lösung eindringt und eine gleichmässigere Wirkung ausübt, ferner aber auch, weil man so vor dem lästigen Auswaschen herkommt, das ja sonst nöthig wird. Feine Strukturen werden in vielen Fällen besser konservirt, da das Auftreten von Veränderungen durch Osmose beim Räuchern ja ausgeschlossen ist.

37. Fixiren mit Lösungen von Osmiumsäure. Gegenwärtig benutzt man reine Osmiumsäure in Lösung nur noch selten, sondern mischt sie gewöhnlich anderen Mitteln, z. B. der Chromsäure, bei. In Wasser gelöst wird sie in Stärken von $^1/_{20}$—2 % gebraucht. Man hat früher meist $^1/_2$—1 % angewandt, aber die Neueren scheinen mehr zu längerer Einwirkung von schwächeren Lösungen zu neigen. Für Infusorien $^1/_2$ % einige Sekunden lang; Poriferen $^1/_{20}$—$^1/_{10}$ % einige Stunden; Mollusken 1—2 % 24 Stunden; Wirbelthiere: Epithelien $^1/_{10}$—$^1/_2$ % 1 oder 2 Stunden; meroblastische Eier $^1/_{10}$ % 24 Stunden; markhaltige Nerven $^1/_{10}$—1 % 20 Minuten bis 2 Stunden; Tastkörperchen $^1/_3$—1 % 24 Stunden; Retina $^1/_4$—2 % 10 Minuten bis 24 Stunden; Kerne $^1/_{10}$—2 % 2 bis 3 Stunden. Diese Zeitangaben liefern hoffentlich eine allgemeine Anschauung von der Praxis (Genaueres s. bei den einzelnen Geweben), scheinen mir aber gar gross zu sein, wenigstens für nicht sehr umfangreiche Objekte. Auch bin ich der Meinung, stärker als $^1/_2$ %ig solle man die Säure gar nicht nehmen, in der Regel sogar nur $^1/_{10}$ %ig; die Anwendung von 1—2 %iger hat ernste Bedenken gegen sich.

Oft kann man vortheilhaft den Lösungen unmittelbar vor dem Gebrauch $^1/_2$—1 % Essig- oder Ameisensäure zusetzen.

Verwendet man Lösungen in destillirtem Wasser ohne weiteren Zusatz, so muss man sie nach Flemming (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 181) im Dunkeln auf die Gewebe einwirken lassen; dagegen ist das nicht nöthig mit den Gemischen von Flemming oder Hermann. Soll die Einwirkung lange dauern, so muss man mit Rücksicht auf die grosse Flüchtigkeit der Osmiumsäure gut verschliessbare Gefässe anwenden.

Die Kombination von Osmiumsäure mit Alkohol ist Ranvier und Vignal zu verdanken (Ranvier, Leçons d' Anat. génér., App. term. d. muscles de la vie organ. p. 76; Vignal, Arch. Phys. Paris 1884 p. 181). Sie mischen gleiche Volumina von 1%iger Osmiumsäure und 90%igem Alkohol, gebrauchen sie sofort, waschen hinterher mit 80%igem Alkohol, dann mit Wasser aus und färben 48 Stunden lang in Pikrokarmin oder einem Hämateïngemisch. Viallanes hat diese Methode für histologische Untersuchungen an Insekten benutzt.

Kolossow (Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 51) empfiehlt als ein Gemisch, das sehr leicht in die Gewebe eindringe, eine $^1/_8$%ige Lösung von Osmiumsäure in einer 2- oder 3%igen von Urannitrat oder Uranacetat. Später (ibid. 9. Bd. 1892 p. 39) rühmt er aus dem gleichen Grunde ein Gemisch von 50 ccm Alkohol absol., 50 ccm destill. Wasser, 2 ccm konz. Salpetersäure und 1—2 g Osmiumsäure; es halte sich an einem kühlen Orte unbegrenzt lange.

Mann (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 481) empfiehlt zum Fixiren von Nervencentren gleiche Volumina von 1%iger Osmiumsäure und gesättigter Lösung von Sublimat in Normalsalzwasser (0.75%), die aber erst unmittelbar vor dem Gebrauch zu mischen sind; so werde die Quellung der Gewebe verhindert und später die Färbung erleichtert.

38. Nachbehandlung nach der Osmiumsäure. Den Ueberschuss an Osmiumsäure muss man vor Allem auswaschen, und zwar mit Wasser.[1]) Indessen trotz der grössten Sorgfalt dabei bleibt doch häufig etwas Säure in den Geweben zurück und schwärzt sie mit der Zeit zu sehr. Man sollte sie daher entweder in Pikro- oder Ammoniakkarmin auswaschen oder sie auf 24 Stunden in eine Lösung von Kaliumbichromat (z. B. die Müllersche oder Erlickische) oder in $^1/_2$%ige Chromsäure oder in Merkels Gemisch oder endlich in eine schwache Lösung von gelbem Blutlaugensalz oder Cyankalium bringen. Die Behandlung mit Bichromaten gewährt den Vortheil, die Färbung mit Karmin- oder Hämatoxylingemischen sehr zu erleichtern. Max Schulze empfahl Auswaschen und Aufbewahren der Objekte in flüssigem Kaliumacetat, aber ich glaube, die Vorzüge dieser Methode sind illusorisch.

---

[1]) Böhm & Oppel (Taschenbuch 3. Aufl. 1896 p. 24) spülen die Gewebe wenigstens 2 Stunden lang mit destill. Wasser ab und bringen sie dann direkt in 90%igen Alkohol. [M.]

Fol hat Behandlung mit einer schwachen Lösung von Ammoniumkarbonat empfohlen. Aber am besten ist es jedenfalls, die Präparate ordentlich zu bleichen (§ 568 u. folgende). Das lässt sich vielleicht am bequemsten,[1]) wie von Fol, Brass und Overton empfohlen, mit Wasserstoffhyperoxyd thun, das die reduzirte Osmiumsäure wieder regenerirt. Nach Overton (Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 9) reichen dazu einige Minuten bei einem Gemisch von 1 Theil käuflichem Wasserstoffhyperoxyd und 10—25 Theilen 70—80 %igem Alkohol aus. (Das käufliche ist leicht mit H Cl angesäuert und hält sich im Dunkeln gut, aber mit Alkohol muss man es jedesmal frisch mischen). Binet (Journ. Anat. Phys. Paris Tome 30 1894 p. 470) hat mit Erfolg bei Schnitten Kaliumhypermanganat angewandt. Die älteste Methode zum Entfernen des reduzirten Osmiums aus den Geweben rührt von P. Mayer her (Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. 1880 p. 8); Genaueres s. im § 568.

Die oben § 36 nach der Räucherung mit Osmiumsäure empfohlenen Färbmittel sind auch hier nützlich, ausserdem ist aber auch Ammoniakkarmin für stark fixirte Objekte wirklich gut. Für Schnitte lassen sich natürlich in beiden Fällen Safranin und die anderen kernfärbenden Theerfarben mit Vortheil anwenden.

39. Charakter der Färbung mit Osmiumsäure. Im Allgemeinen konservirt Osmiumsäure, namentlich als Dampf, die Form der Zellen getreuer als irgend ein anderes Reagens. Indessen sind doch einige Nachtheile ausser den schon oben im § 27 genannten damit verknüpft. Das Vermögen, in die Tiefe zu dringen, ist sehr gering; sind daher die Objekte nicht ganz klein, so werden die äusseren Schichten überfixirt, bevor noch die Säure zu den inneren gelangt ist. Ueberfixirte Zellen nun sehen eigenthümlich homogen, glasig oder colloid aus, da alle ihre Bestandtheile in Folge der Coagulation das Licht so stark brechen, dass man wenig oder gar keine Einzelheiten darin wahrnimmt. Auch färben sie sich nur sehr schlecht oder gar nicht. Solche Zellen sind als osmirt bekannt. Ist dieser Zustand aber einmal eingetreten,

---

[1]) Nach Fol (Lehrbuch p. 174) ist zum Bleichen besser als Javellelauge oder Wasserstoffhyperoxyd eine schwache wässerige Auflösung des rothen Blutlaugensalzes. Auch das gelbe könne, obwohl mit grösserer Vorsicht, angewendet werden. Ich habe allerdings mit jenem leidliche Resultate erzielt, mit dem gelben hingegen nicht, und muss ferner einwenden, dass das rothe nur in wässeriger Lösung. nicht aber in Alkohol wirkt. was mir gegenüber meiner Bleichmethode (§ 568) ein Nachtheil zu sein scheint. Wasserstoffhyperoxyd (§ 570) als leicht zersetzliche Flüssigkeit ist ebenfalls nicht besonders zu empfehlen, und Natriumhyperoxyd (§ 570) hat andere Uebelstände im Gefolge. [M.]

so giebt es kein Mittel dagegen, und daher sollte man auch die Lösungen nur genau so stark wählen wie nöthig. Die erwähnte Gefahr wird nun zwar verringert, wenn man die Osmiumsäure in Verbindung mit anderen Mitteln braucht, wie z. B. mit Chromsäure, aber keineswegs ganz aufgehoben; auch die Gemische von Flemming, besonders das starke, schwärzen bei unvorsichtiger Anwendung die äusseren Zellschichten leicht. Allerdings hat dies für gewöhnliche histologische Arbeiten Nichts zu bedeuten, aber handelt es sich um feinere Zellstrukturen, so sollte man ja keine Schlüsse aus solchen osmirten Zellen ziehen, sondern sich in erster Linie an die Zellen halten, die 4 oder 5 Schichten tiefer liegen und daher gewöhnlich in der richtigen Weise fixirt sind.

Osmiumsäure färbt alle Fettsubstanzen schwarz, jedoch lässt sich das osmirte Fett durch Terpentinöl etc. wegschaffen (§ 783).

40. Chromsäure. Das Chromtrioxyd (CrO_3) findet sich im Handel als rothe Kristalle, die sich in Wasser leicht unter Bildung von Chromsäurehydrat (H_2CrO_4) lösen. Die Kristalle sind leicht zerfliesslich, und man hält daher am besten die Säure in 1 %iger Lösung vorräthig. Auch dürfen die Kristalle nicht mit organischen Körpern in Berührung kommen, da sie sonst leicht zu Chromoxyd (Cr_2O_3) reduzirt werden.

Man gebraucht die Chromsäure in wässeriger oder alkoholischer (§ 42) Lösung. Die wässerige ist am besten $^1/_{10}$—1 % stark, und man legt die Objekte nur auf einige Stunden hinein. Nervengewebe kommt auf einige Stunden in eine Lösung von nur $^1/_{50}$—$^1/_8$ %. Starke Lösungen (5 %) sollte man nur wenige Sekunden einwirken lassen.

Die Objekte müssen nachher in Wasser ausgewaschen werden und kommen erst dann in Alkohol oder ein Färbmittel. Langes Waschen ist nothwendig, wenn man sie färben will, es sei denn, man brauche eine Theerfarbe. Man kann ja auch in Alkohol auswaschen, und das mag sogar für einzelne Fälle gut sein, aber im Allgemeinen ist das nicht zu empfehlen. Am besten wäscht man viele Stunden lang in fliessendem Wasser.[1]) Färben lassen sie sich am leichtesten

[1]) Das Waschen mit Wasser, namentlich mit fliessendem, also doch wohl schwach alkalischem, ist vielleicht nicht besonders schädlich für die Gewebe, jedenfalls aber eine lange Operation, die sich auf folgende einfache Weise umgehen lässt. Man bringe die Objekte aus dem Chromgemisch nach flüchtigem Abspülen mit Wasser direkt in Alkohol von 70 %, wasche sie darin im Lichte, besser aber nach Virchow (§ 41) im Dunkeln aus, bis der Alkohol auch nach

mit wässerigen Färbmitteln, denn Wasser scheint ihnen gar nicht zu schaden: die Chromsäure geht offenbar mit den Geweben eine chemische Verbindung ein, die vom Wasser weder physikalisch noch chemisch afficirt wird. Der beste Farbstoff ist Hämateïnthonerde oder (für Schnitte) Eisenhämatoxylin oder eine Theerfarbe; will man aber gute Resultate erzielen, so muss man vorher ganz sorgfältig ausgewaschen haben, und das kann Tage lang dauern.

Die Chromsäure dringt nicht leicht in die Tiefe und wird deshalb, aber auch aus anderen Gründen, nur noch selten allein verwandt, spielt dagegen eine sehr wichtige Rolle in den gleich zu erwähnenden Gemischen, von denen die Flemmingschen sicher die wichtigsten sind. Was man gegen die Chromsäure hauptsächlich einwenden kann, ist, dass sie einige der flüssigen Eiweisskörper in den Geweben als Fäden oder Netze niederschlägt, und zwar oft in so regelmässiger Form, dass sie normale, den Geweben eigenthümliche Strukturen vortäuschen. Dieser Vorwurf trifft zwar alle Gemische mit Chromsäure, aber abgesehen hiervon fixiren sie die Gewebe sehr gut.

41. Wirkung des Lichtes auf die mit Chromsäure behandelten Objekte. Bringt man die mit Chromsäure oder chromsauren Salzen behandelten Objekte zur Härtung oder Aufbewahrung in Alkohol, so schlägt sich schon bald ein feines Präcipitat auf sie nieder und verhindert so das weitere Eindringen des Alkohols. Vorheriges Waschen erschwert die Bildung dieses Niederschlages nicht, ebensowenig öfteres Wechseln des Alkohols. Dagegen hat H. Virchow

---

öfterem Wechseln farblos ist, und führe sie dann entweder in Paraffin über, um erst aus den Schnitten das überflüssige Chromoxyd (oder wie die Form heissen mag, in der sich das Chrom mit den Geweben verbunden hat) zu entfernen, oder thue dies sofort. Die Schnitte behandelt man einfach mit dem gebräuchlichen salzsauren Alkohol: sie werden in kurzer Zeit fast weiss und färben sich dann nach der Entsäuerung ganz vorzüglich auch mit den gewöhnlichen Färbmitteln. Will man jedoch in toto entfärben, so bringt man die Stücke entweder in verdünnte Schwefelsäure (1 Vol. auf 20 Vol. Wasser) oder Salpetersäure (1:10); sie werden in längstens einigen Stunden hell graugrün und färben sich nach Entfernung der Säure gut durch. Zwar sind sie natürlich, da sie an anorganischer Substanz verloren haben, nicht mehr so hart wie früher, lassen sich aber unter 90%igem Alkohol aus freier Hand mit dem Rasirmesser doch in dünne Schnitte zerlegen und haben histologisch, so weit ich sehen kann, durch die Entfernung des meisten Chroms nicht gelitten. — Unna (Arch. Mikr. Anat. 30. Bd. 1887 p. 47) lässt in den Geweben das Chrom als chromsaures Chromoxyd vorhanden sein und entfernt es durch Behandlung mit Wasserstoffhyperoxyd; Overton (Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 9) verwendet dazu (bei Algen) eine schwache wässerige Lösung von schwefeliger Säure, die es zu schwefelsaurem Chromoxyd auflöst. [M.]

(Arch. Mikr. Anat. 24. Bd. 1885 p. 117) gefunden, dass es sich im Dunkeln nicht bildet: zwar wird der Alkohol genau so gelb wie im Licht (und sollte daher auch oft gewechselt werden), aber kein Niederschlag tritt auf. Verfährt man also nach dieser Vorschrift, so ist das vorherige Waschen mit Wasser unnöthig oder kann wenigstens stark abgekürzt werden (s. hierzu auch § 40 Anm.).

42. Chromsäure und Alkohol. Klein (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 18 1878 p. 315) hat bei seinen Untersuchungen über Zellen und Kerne ein Gemisch von 2 Theilen einer $^1/_6$ %igen Chromsäurelösung und 1 Theil Alkohol von 90 % viel benutzt und damit bessere Resultate erzielt als mit anderen Reagentien, Osmiumsäure nicht ausgenommen. Zum Färben diente ihm ein Hämateïngemisch. — Lo Bianco (Mitth. Z. Stat. Neapel 9. Bd. 1890 p. 443) verwendet zum Fixiren einiger Seethiere ein Gemisch von gleichen Theilen 1 %iger Chromsäure und Alkohol von 70 %.

Der Zusatz von Alkohol zur Chromsäure, um sie leichter in die Gewebe hinein zu schaffen, scheint mir ein guter Gedanke zu sein, und man könnte sich darüber wundern, dass solche Gemische nicht öfter gebraucht werden. Jedenfalls darf aber der Alkohol nicht direkt auf feste Chromsäure gebracht werden, weil sonst eine sehr heftige Reaktion eintreten würde; auch sollten die Gemische im Dunkeln aufbewahrt werden. S. übrigens auch § 93 und § 50 Anm.

43. Chromessigsäure (Flemming, Zellsubstanz, Kern- und Zelltheilung 1882 p. 382): Chromsäure 2—2$^1/_2$ Theile, Essigsäure 1 Theil, Wasser 1000 Theile.

Nach Flemming ist sie das beste Reagens zum Studium der achromatischen Bestandtheile bei der Kerntheilung. (Allerdings schrieb F. das 1882 und hält es jetzt wohl kaum noch aufrecht.) Färbung mit Hämateïnthonerde (für Safranin oder andere Theerfarben taugen die Präparate nicht).

Ich empfehle als gutes Fixir- und Härtmittel für Anneliden und wohl auch für andere Thiere folgendes mir durch einen Studenten von Prof. Ehlers angegebene (vielleicht sonst nirgend publizirte) Gemisch: Chromsäure $^1/_2$—1 g, Wasser 100 g, Eisessig 1—5 Tropfen. Diese wenige Essigsäure hält schon der etwaigen Schrumpfung durch die Chromsäure die Waage. Aehnlich ist Lo Biancos (Mitth. Z. Stat. Neapel 9. Bd. 1890 p. 443) zum Fixiren von Seethieren sehr nützliche Chromessigsäure No. 1, nämlich 1 Theil 50 %ige Essigsäure und 20 Theile 1 %ige Chromsäure (über seine Chromessigsäure No. 2 s. § 71). — S. auch § 95 das Gemisch von Burckhardt.

44. Chromameisensäure. Rabl (Morph. Jahrb. 10. Bd. 1884 p. 215, 216) setzt zu 200 ccm einer 1/3 %igen Chromsäurelösung 4 oder 5 Tropfen konz. Ameisensäure, aber erst unmittelbar vor dem Gebrauch. Die Objekte bleiben 12—24 Stunden darin, werden mit Wasser ausgewaschen, in Alkohol gehärtet und mit Hämateïnthonerde oder Safranin gefärbt. Zum Studium der Karyokinese ist dies anerkannt eins der allerbesten Mittel.

45. Chromosmiumsäure. Flesch (Arch. Mikr. Anat. 16. Bd. 1879 p. 300) hat ein Gemisch von Osmiumsäure 1, Chromsäure 2½, Wasser 1000 Theilen ursprünglich für das Gehörorgan der Vertebraten angegeben, aber es lässt sich allgemein anwenden. Es braucht nicht im Dunkeln aufbewahrt zu werden. Die Objekte können 24—36 Stunden darin bleiben, ohne allzu schwarz zu werden. Nach Flemming konservirt es die Kernfiguren gut, aber sie werden blass und färben sich schlecht. Das Gemisch wirkt aber in dieser Richtung besser, wenn man Essigsäure, Ameisensäure oder sonst eine Säure hinzufügt; die Kernfiguren werden dann schärfer und färben sich auch hinterher besser mit Hämateïnthonerde, Pikrokarmin oder Gentianaviolett. Flemming empfiehlt daher seine bekannte Formel (§ 46), und diese hat in der That die von Flesch verdrängt. Lo Bianco (Mitth. Z. Stat. Neapel 9. Bd. 1890 p. 443) verwendet zum Fixiren von Seethieren ein Gemisch von 1 Theil 1%iger Osmiumsäure und 50 Theilen 1%iger Chromsäure.

46. Chromosmiumessigsäure nach Flemming (Zellsubst., Kern- u. Zelltheil. 1882 p. 381); **schwaches Gemisch:** Chromsäure 2½ g, Osmiumsäure 1 g, Eisessig 1 g, Wasser 1 Liter. Die besten Resultate, soweit gute Fixirung in Frage kommt, erzielt man durch kurze Einwirkung (etwa ½ Stunde) dieses Gemisches. Man darf es aber auch ohne Nachtheil mehrere Stunden oder Tage, ja nach einigen Autoren[1]) sogar Wochen oder Monate einwirken lassen. Hinterher wäscht man sehr sorgfältig mit Wasser aus und färbt entweder in toto mit Hämateïnthonerde (es geht auch mit anderen Farben, aber nur sehr schwer, mithin nicht zu empfehlen) oder noch besser die Schnitte mit Safranin, anderen Theerfarben, Eisenhämatoxylin oder Kernschwarz.

Um sich das Gemisch aus den vorräthigen Lösungen zu bereiten, nehme man

1%ige Chromsäure 25, 1%ige Essigsäure 10,
1%ige Osmiumsäure 10, Wasser 55 Maasstheile.

---

[1]) So lässt z. B. Flemming (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. 1897 p. 174) Bindegewebe in Chromosmiumessigsäure oder Hermanns Gemisch mindestens einige Wochen, meistens einige Monate. [M.]

Hat man die Osmiumsäure, wie ich oben § 34 empfohlen habe, mit Chromsäure zusammen gelöst vorräthig, so nimmt man 20 Maasstheile Chromsäure von 1 %, 5 von dieser Osmiumlösung und 65 Wasser. (Ueber das allmähliche Verderben dieser Lösungen s. im folgenden §.)

Oft schon ist darauf hingewiesen worden, dass dieses Flemmingsche Gemisch neben dem von Hermann in den Fällen, wo es überhaupt anwendbar ist, wohl das beste Fixirmittel bildet. Es hat aber auch nicht an Kritiken gefehlt. So fand es Faussek (Zeit. Wiss. Z. 44. Bd. 1887 p. 694) für den Insektendarm völlig unbrauchbar: die Intima verschwand darin, und die Zellen flossen zu einer kompakten Masse zusammen. Nach Arnold (Arch. Mikr. Anat. 30. Bd. 1887 p. 205) konservirt es die Zellkörper nicht getreu, und nach A. Kotlarewsky (Mitth. Nat. Ges. Bern f. 1887, 1888 p. 3; Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 387) ist es für die Zellen der Spinalganglien weniger gut als die anderen Mittel. Ich selbst habe hingegen in der Konservirung des Zellplasmas bei meinen Versuchen keinerlei Mangel bemerkt.

Man braucht übrigens das Gemisch durchaus nicht immer ängstlich genau so zu machen, wie ursprünglich vorgeschrieben. So empfiehlt Fol (Lehrbuch 1884 p. 100) zu nehmen: 1 %ige Chromsäure 25 Maasstheile, 1 %ige Osmiumsäure 2, 2 %ige Essigsäure 5 und Wasser 68 Maasstheile. Mithin ist sein Gemisch an Osmiumsäure viel schwächer als das von Flemming. Im Traité d. Méth. techn. von Lee & Henneguy (1887) habe ich Fols Gemisch als im Allgemeinen besser empfohlen, glaube jetzt aber, dass es wenigstens in Bezug auf getreue Fixirung ein Schritt nach einer falschen Richtung war. Zwar lässt sich nach Fols Gemisch besser mit Karmin färben, aber das ist auch Alles.

Noch schwächer an Osmiumsäure (nur 1 Vol. an Stelle der 2 Vol.) ist das Gemisch von Cori (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1890 p. 441), aber ich bleibe auch dem gegenüber bei meiner obigen Meinung.

Ueber das Gemisch von Wistinghausen s. unten § 624.

47. Chromosmiumessigsäure nach Flemming (Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 349); **starkes Gemisch:** 1 %ige Chromsäure 15 Maasstheile, 2 %ige Osmiumsäure 4 Maasstheile, Eisessig 1 Maasstheil.

Hat man 2 %ige Osmiumsäure nicht zur Hand, so nehme man 10 %ige Chromsäure 15, 1 %ige Osmiumsäure 80, Eisessig 10 und Wasser 95 Maasstheile.

Grosse Vorräthe von diesem Gemisch können mit der Zeit verderben, vielleicht wegen der beträchtlichen Menge organischer Säure darin (Flemming). Ich empfehle daher, es häufiger in kleinen Portionen aus Lösungen zusammenzugiessen, in denen die Osmiumsäure von der Essigsäure getrennt gehalten wird. Da nun das Gemisch besteht aus: Chromsäure 0.15, Osmiumsäure 0.08, Eisessig 1, Wasser 19, so möge man vorräthig halten:

A. 1 %ige Chromsäure 11 Theile, Wasser 4 Theile, Eisessig 1 Theil,

ferner B. eine 2 %ige Lösung von Osmiumsäure in 1 %iger Chromsäure, und man mischt dann beim Bedarf 4 Theile von A. mit 1 Theil von B. Oder man hält das ganze Gemisch mit Ausnahme der Essigsäure fertig und setzt dann vor dem Gebrauch 5 % Eisessig hinzu.

Auf alle Fälle ist es gut, nicht viel vom Gemisch vorräthig zu halten. Denn bei der Flüchtigkeit der Osmiumsäure ist es nur natürlich, dass alte Lösungen sie nicht mehr in der richtigen Menge enthalten; mithin wird das Härtvermögen schwächer und hält das Quellvermögen der Essigsäure nicht genug im Zaume.

Für manche Zwecke ist es sicherlich vortheilhaft, wenn man von der Essigsäure bedeutend weniger nimmt.

Merk (Denkschr. Akad. Wien 53. Bd. 1887; Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 237) mischt 2 %ige Chromsäure 7 ½ Theile mit Wasser 3 ½ und Essigsäure 1 Theil und setzt dazu 8 Theile 1 %ige Osmiumsäure. Dabei bleibt aber die alte Schwierigkeit bestehen, Osmiumsäure in wässeriger Lösung vorräthig zu halten.

Man braucht sich übrigens durchaus nicht genau an die von Flemming angegebenen Verhältnisse zu halten. So verwendet z. B. Carnoy (La Cellule Tome 1 1885 p. 211) ein noch stärkeres Gemisch. Podwyssozki (Beitr. Path. Anat. Ziegler 1. Bd. 1886; Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 405) empfiehlt namentlich für Drüsen ein Gemisch mit Sublimat, nämlich Chromsäure zu 1 % in ½ %iger Sublimatlösung gelöst 15 ccm, 2 %ige Osmiumsäure 4 ccm, Eisessig 6—8 Tropfen. Das Sublimat soll das Eindringen der Osmiumsäure erleichtern, aber der Färbung schaden; von der Essigsäure ist weniger genommen worden, um das Schwellen der histologischen Elemente zu verhindern.

Das starke Gemisch hat Flemming in erster Linie nur für die Jagd auf Kernfiguren empfohlen und durchaus nicht im Allgemeinen. Später zeigte es sich jedoch in manchen anderen Fällen anwendbar und alsdann dem schwachen Gemisch bedeutend überlegen. Nur passt es durchaus nicht für alle Objekte, und Flemming hat schliesslich selbst darauf hingewiesen, dass einige Forscher es für Zwecke brauchen, für die es nicht taugt.

Arnold (s. oben § 46) sagt, man dürfe es nicht anwenden, wenn man die Struktur der Kerne von Wanderzellen studiren wolle; was er ferner gegen das schwache Gemisch geltend macht, gilt auch mehr oder weniger von dem starken. Indessen darf man dem nicht zu viel Gewicht beilegen: man fixire zarte Gewebe 24 Stunden oder länger, wasche sie wenigstens 1 Stunde lang in fliessendem Wasser aus, dann 24 Stunden lang in immer stärkerem Alkohol, bette sie ein, färbe die Schnitte mit Safranin oder Gentianaviolett — und man wird sich nur wenig über mangelhafte Konservirung zu beklagen haben.

Im starken Gemisch werden die Gewebe nicht tiefer braun, als im schwachen, eher weniger tief.

Fett wird von beiden Gemischen geschwärzt, aber das geschwärzte Fett lässt sich aus den Geweben durch Terpentinöl etc. wegschaffen (§ 783).

Die Bemerkungen im § 39 über Ueberhärtung gelten für beide Gemische, speziell für das starke. Ueber das Färben s. § 46.

48. Platinosmiumessigsäure oder **Hermanns Gemisch.** Dieses äusserst wichtige Mittel ist von Hause aus nur eine Modifikation des Flemmingschen, worin an Stelle der Chromsäure Platinchlorid getreten ist. S. im Uebrigen § 68.

49. Salpetersäure. Altmann (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. f. 1881 p. 219) gebraucht zum Fixiren verdünnte Salpetersäure (3—3½% reine Säure), die ein spezif. Gewicht von etwa 1.02 hat; man kann mit einem Aräometer die richtige Konzentration leicht feststellen. Stärkere Gemische ergaben ihm kein so gutes Resultat. Nach längerem Probiren habe ich mich davon überzeugt, dass die Altmannsche Flüssigkeit viel zu schwach zum allgemeinen Gebrauch ist und daher ganz abgeschafft werden sollte.

His (ibid. f. 1877 p. 115) empfahl 10%ige Salpetersäure. Flemming verwandte früher eine 40—50%ige für Eier von Invertebraten; natürlich fixirt eine so starke sehr rasch. — Ueber Salpetersäure und Sublimat s. § 62.

Salpetersäure besitzt die werthvolle Eigenschaft, den Dotter zu härten, ohne ihn brüchig zu machen. Aber für allgemeine Zwecke ist sie jedenfalls durch Perényis Gemisch (s. folg. §) verdrängt worden.

50. Chromsalpetersäure nach Perényi (Z. Anzeiger 5. Jahrg. 1882 p. 459). Man nehme 4 Theile 10%ige Salpetersäure, 3 Theile Alkohol (Stärke nicht angegeben, wohl 90%) und 3 Theile ½%ige Chromsäurelösung. Das Gemisch wird schon bald hellviolett. Man bringt die Objekte auf 4—5 Stunden hinein, dann auf 24 Stunden in Alkohol von 70%, einige Tage in stärkeren und 4—5 Tage in absoluten. Dann sind sie zum Schneiden gut. Dies Verfahren soll den Vortheil bieten, dass die Blastomeren und ihre Kerne perfekt fixirt sind, die Eier nicht porös werden und sich wie Knorpel schneiden.

Ich selber habe dieses Gemisch[1]) ganz besonders zum Konserviren von Thieren für Museen und zum Seciren benutzt und es hierfür stets

[1]) Ueber das Gemisch von Perényi scheint man bisher sich jeder Aeusserung vom Standpunkt des Chemikers enthalten zu haben. Es ist aber leicht zu konstatiren, dass die Chromsäure, sobald die Flüssigkeit violett geworden ist, nicht mehr als solche, sondern als Chromoxyd darin vorkommt, und dass auf ihre Kosten der Alkohol sich oxydirt und zum Theil in Folge der Gegenwart der Salpetersäure in Salpeteräther verwandelt hat. Mithin reduzirt sich das Gemisch auf einen Alkohol von höchstens 30%, der etwa 5% Salpetersäure enthält. Macht man sich unter Fortlassung der Chromsäure ein analoges Gemisch, so

vortrefflich befunden. Speziell bei weichen Thieren erhält sich die äussere Form gut, und von Schrumpfung ist dabei keine Rede. Daraus folgt natürlich noch keineswegs, dass sie nun auch histologisch gut konservirt seien. — Eine spezielle Formel für embryologische Untersuchungen s. im Z. Anzeiger 11. Jahrg. 1888 p. 138 u. 196.

51. Chrompikrinsäure nach Fol (Lehrbuch p. 100).

Gesättigte Lösung von Pikrinsäure in Wasser 10 Raumtheile, 1%ige Chromsäurelösung 25 und Wasser 65 Raumtheile. Unmittelbar vor dem Gebrauch mag man „noch etwa 0.005 Osmiumsäure“ zusetzen, um die Wirkung energischer zu machen. Auswaschen mit heissem Wasser (fast kochendes ist am besten) und dann mit Alkohol. Fol sagt, dies Mittel härte Gewebe ausserordentlich gut und verhindere die Färbung gar nicht, dringe aber nicht tief ein und fixire nur langsam. Ich habe bei Anneliden gute Erfahrungen damit gemacht.

Fols Gemisch mit einer Spur Essigsäure habe ich als Hänsels Flüssigkeit citirt gefunden, weiss aber nicht, mit welchem Recht.

52. Chromsäure und Platinchlorid oder **Merkels Gemisch** (Merkel, Macula lutea d. Menschen Leipzig 1870 p. 19): je 1 Theil Platinchlorid und Chromsäure auf 800 Theile Wasser. Da es nur langsam einwirkt, so müssen die Objekte mehrere Stunden oder selbst Tage lang darin bleiben. Man wäscht dann mit Alkohol von 50—70% aus. Trotz der Chromsäure färben sich die Objekte vorzüglich. Legt man Thiere, die mit Osmiumsäure fixirt worden sind, einige Stunden lang hinein, so wird die Schwärzung sicher verhindert.

53. Kaliumbichromat und Kupfersulfat nach Kultschitzky (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 348). Man löst beide Salze bis zur Sättigung in 50%igem Alkohol und setzt kurz vor dem Gebrauch auf je 100 ccm 5 oder

---

konservirt es nach meinen Erfahrungen ganz so wie das Perényische, d. h. wie ein so schwacher saurer Alkohol überhaupt kann, und das ist eher schlecht als gut. Die Objekte schrumpfen darin allerdings nicht; eher quellen sie auf, mitunter recht beträchtlich. In der That fehlt es denn auch nicht an Stimmen, die es für die Konservirung von Eiern durchaus verwerfen. So ist z. B. Cholodkovsky bei seinen Untersuchungen über die Embryogenese von *Blatta* durch Anwendung des Gemisches von Perényi zu seltsamen Resultaten gekommen, und dies habe nicht nur ich im Z. Jahresbericht angedeutet (f. 1891 Arthropoda p. 61), sondern es ist auch später von Wheeler und Heymons (ibid. f. 1893 p. 71 und f. 1895 p. 61) ausdrücklich auf diese Fehlerquelle hingewiesen worden. Jedenfalls kommt man also einfacher zum Ziel, wenn man schlechtweg sauren Alkohol nimmt, wie ich ihn bereits 1880 (Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. p. 7) empfohlen habe; und je nach den Objekten mag man ihn stärker oder schwächer wählen. [M.]

6 Tropfen Essigsäure hinzu. Die fein pulverisirten Salze lässt man im Dunkeln 24 Stunden in Berührung mit dem Alkohol. Auch die Objekte müssen im Dunkeln 12—24 Stunden lang in dem Gemisch bleiben, denn im Hellen giebt es Präcipitate. Dann kommen sie auf 12—24 Stunden in starken Alkohol und sind nun schneidfähig.

Das Gemisch soll die Gewebe getreu fixiren, d. h. die Eiweisskörper nicht netzförmig niederschlagen (s. p. 28), und hierfür sorgen die beiden Salze; ferner auch durch seine Essigsäure das Chromatin getreu konserviren. Ich selber habe gar keine Erfahrungen hierüber. Sehr wahrscheinlich fixirt es gut, schädigt aber die Färbbarkeit der Gewebe.

Neuerdings (Arch. Mikr. Anat. 49. Bd. 1897 p. 8) verwendet Kultschitzky zum Fixiren ein Gemisch von 2 Theilen Kaliumbichromat, $^{1}/_{4}$ Theil Sublimat, 50 Theilen 2 $^{0}/_{0}$iger Essigsäure und 50 Theilen Alkohol von 96 $^{0}/_{0}$. Da ein Theil des Bichromats ausfällt, so soll man die Flüssigkeit erst nach 24 Stunden filtriren. Man lässt die Gewebe von Wirbelthieren 4—6 Tage lang darin.

54. Kaliumbichromat, Platinchlorid und Osmiumsäure nach Johnson wirkt als zartes Fixirmittel ganz vorzüglich. Genaueres s. in § 99.

Lo Bianco (Mitth. Z. Stat. Neapel 9. Bd. 1890 p. 443) verwendet für Seethiere ein Gemisch von 100 ccm 5 $^{0}/_{0}$iger Lösung von Kaliumbichromat und 2 ccm 1 $^{0}/_{0}$iger Osmiumsäure.

55. Die chromsauren Salze dienen eigentlich mehr zum Härten als zum Fixiren. Ihre Wirkung auf die Gewebe ist sehr mild und gleichmässig, aber sie dringen durchaus nicht gut ein und wirken auch sehr langsam. Immerhin mögen sie zum Fixiren einiger Gewebe, z. B. bei den Mollusken, nützlich sein. Genaueres s. in § 95—101.

56. Kupfersulfat. Lo Bianco (Mitth. Z. Stat. Neapel 9. Bd. 1890 p. 442, 443) verwendet es zum Fixiren von Seethieren entweder rein in 5—10 $^{0}/_{0}$iger Lösung oder als Gemisch: 10 Theile einer 10 $^{0}/_{0}$igen Lösung mit 1 Theil konz. Sublimatlösung. Man muss aber die Thiere mit Süsswasser gut auswaschen, sonst treten in ihnen leicht Niederschläge auf. — S. auch § 868. — Ueber Kupfersulfat und Osmiumsäure für elastisches Gewebe s. § 791, über K. und Kaliumbichromat § 53.

57. Alaun ist auch zum Fixiren verwandt worden. Nach ausgedehnten Versuchen nenne ich ihn aber nur, um dringend vor seinem Gebrauch zu warnen.

58. Schweflige Säure. Waddington (Journ. R. Micr. Soc. London (2) Vol. 3 1883 p. 185) empfiehlt eine gesättigte Lösung von schwefliger Säure in Alkohol (hergestellt durch Einleiten des Gases) statt der Osmiumsäure zum Fixiren. — Overton (Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 9) benutzt eine wässerige Lösung zum Fixiren von Algen.

B. Chloride.

59. Quecksilberchlorid oder **Sublimat.** Gewöhnlich wird angegeben, Sublimat löse sich in etwa 16 Theilen kaltem oder 3 Theilen kochendem Wasser. In Alkohol ist es leichter löslich als in Wasser, und in

Aether noch leichter. Die Löslichkeit in allen dreien wird noch vermehrt durch Zusatz von Kampher, Salzsäure oder Chlorammonium; mit letzterem und auch Chlornatrium bildet es leicht lösliche Doppelsalze, sodass Seewasser sogar über 15 % löst (s. auch § 60).

Die gewöhnlichen Lösungen in Wasser werden oft schon bald schlecht durch Bildung eines pulverigen Niederschlages, dessen Zusammensetzung mir nicht genauer bekannt ist. In der Annahme, er rühre theilweise vom Ammoniak der Luft her, habe ich seit einiger Zeit den Lösungen stets etwas Salpetersäure zugesetzt und in der That gefunden, dass sie sich besser halten. Uebrigens ist der Zusatz von 1 Tropfen Salpetersäure auf 1—2 ccm der Lösung schon von Frenzel (§ 62) empfohlen worden. Jedenfalls sollte man für Objekte, wo man eine möglichst energische Fixation verlangt, nur frische Lösungen verwenden. Die Lösungen in destillirtem Wasser müssen auf Lakmuspapier deutlich sauer reagiren, die in starken Lösungen von Kochsalz sind neutral.

Zum Fixiren werden sehr oft die Sublimatlösungen unvermischt gebraucht, und das geht auch an, aber meist wird die Fixirung besser, wenn man Essigsäure hinzugesetzt hat, etwa 1 %. Ich finde eine gesättigte Lösung von Sublimat in 5 %iger Essigsäure für Seethiere sehr gut. van Beneden hat eine ähnliche in 25 %iger Essigsäure empfohlen, und Lo Bianco (Mitth. Z. Stat. Neapel 9. Bd. 1890 p. 443) verwendet ein Gemisch von 2 Theilen gesättigter Sublimatlösung und 1 Theil Essigsäure von 49 %.

Zuweilen ist es rathsam, die allerstärkste Lösung zu nehmen. Meist genügt eine kalt gesättigte Lösung, aber bei sehr kontraktilen Thieren, wie Korallen und Planarien, sollte man eine warm oder sogar heiss gesättigte Lösung brauchen. Für Arthropoden ist oft eine Lösung in Alkohol gut (§ 62). Zarte Objekte hingegen erfordern unter Umständen schwache Lösungen; so fand Harting $^1/_5$—$^1/_2$ %ige für Blutkörperchen gut, und Pacinis Gemische sind etwa von derselben Stärke. Siehe hierüber § 399 ff.

Die Objekte müssen stets aus den Fixirlösungen herausgenommen werden, sobald sie fixirt sind, mit anderen Worten, sobald sie durch und durch opak geworden, d. h. von der Flüssigkeit ganz durchdrungen sind. Für kleine Objekte genügen einige Minuten, so z. B. nach meinen Erfahrungen für die Speicheldrüsen der Larve von *Chironomus* schon 3 Sekunden.

Auszuwaschen ist mit Wasser oder Alkohol. Ich halte diesen für fast immer besser als jenes, und man nimmt zweckmässig etwa 70 %igen (s. auch p. 19). Das Sublimat wird rascher ausgezogen, wenn man etwas Kampher hinzugiebt. Oder besser noch, man setzt nach Mayer

(Internation. Monatsschr. Anat. Phys. 4. Bd. 1887 p. 43) ein wenig Jodtinktur zur Waschflüssigkeit, sei sie nun Wasser oder Alkohol, und wechselt die Flüssigkeit, bis sie nicht mehr durch die Objekte entfärbt wird. Es ist wichtig, das Sublimat sorgfältig aus den Geweben wegzuschaffen, denn sonst werden sie brüchig. Sie werden dies aber auch, wenn sie lange in Alkohol bleiben.

Man hat statt der Jodtinktur auch Jodjodkaliumlösung empfohlen. Aber das ist ganz falsch, denn auf diese Weise fällt Sublimat aus. Ich verdanke diese Angabe meinem Freunde Prof. Gilson.[1])

Hat man den Ueberschuss an Sublimat nicht sorgfältig aus den Geweben entfernt, so treten zuweilen in den Schnitten, wenn sie schon in Balsam liegen, Kristalle einer Quecksilberverbindung auf. Dem ist aber leicht vorzubeugen: man behandelt einfach die Schnitte vor dem Einschluss in Balsam $^1/_4$ Stunde mit Jodtinktur. Man braucht dann auch nicht die Stücke in toto vor dem Färben mit Jod zu behandeln, was oft sehr lange dauert (es sei denn, man wolle das Material vor dem Schneiden lange in Alkohol aufbewahren).

Färben kann man nach Belieben. Die Karminlösungen geben besonders brillante Färbungen.

Die Lösungen von Sublimat dürfen nicht mit Eisen- oder Stahlgeräthschaften in Berührung kommen, denn es bilden sich sonst Niederschläge, die den Objekten schaden könnten. Man nehme daher zum Anfassen oder Bewegen der Objekte Holz oder Glas und zum

---

[1]) Gilson ist hier im Irrthum. Das Quecksilberchlorid wird in den Geweben reduzirt (zu Quecksilberchlorür oder irgend einem Oxydulsalze); bringt man nun Jodkalium allein hinzu, so bildet sich unlösliches Quecksilberjodür, das aber bei Gegenwart von freiem Jod in das Jodid übergeht, und dieses ist bekanntlich in Jodkalium löslich. Ich verwende daher schon seit Jahren in hartnäckigen Fällen, besonders bei Objekten in toto, statt der Jodtinktur Jodjodkalium, nämlich das Gemisch einer Lösung von 5 g Jodkalium in 5 ccm Wasser und von 0,5 g Jod in 45 ccm 90%igem Alkohol. Hiervon setze ich nach Bedürfniss entweder dem Waschwasser oder dem Waschalkohol zu (s. auch Mayer in: Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 28 Anm. 1; ähnlich Apáthy in: Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1897 p. 729 u. 730). — Mann (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 479) hält es für schädlich, die mit Sublimat konservirten Objekte vor dem Schneiden mit Jod zu behandeln, da sie dadurch weich werden und im Paraffin schrumpfen. Er braucht daher das Jodjodkalium in wässeriger Lösung erst für die Schnitte. Schaper (Anat. Anzeiger 13. Bd. 1897 p. 463) hingegen zeigt, dass es unter Umständen sehr schädlich ist, wenn man die Behandlung der Gewebe mit Jod erst auf den Schnitten, nicht schon vor dem Einbetten in Paraffin vornimmt. [M.]

Zerlegen Igelstacheln, Gänsefedern, am besten aber (mit Eisig) Kaktusstacheln.

Bei richtiger Anwendung ist Sublimat im Allgemeinen unzweifelhaft eins der allerbesten Fixirmittel. Es lässt sich fast bei allen Arten von Thieren gebrauchen. Vielleicht empfiehlt es sich ohne weitere Zusätze nicht so sehr für Arthropoden, da es nicht leicht durch Chitin durchdringt. Für Zellenstudien hingegen steht es nach meiner Erfahrung nicht auf der Höhe der Gemische von Flemming und giebt namentlich nicht so feine optische Differenzirungen wie diese.

60. Sublimat nach Lang (Z. Anzeiger 1. Jahrg. 1878 p. 14) für Planarien: Wasser 100 ccm, Chlornatrium 6—10 g, Essigsäure 6—8 g, Sublimat 3—12 g (zuweilen Alaun 1/8 g). — Zweite Vorschrift (ibid. 2. Jahrg. 1879 p. 46): Konzentrirte Lösung von Sublimat in Pikrinschwefelsäure, der man vorher 5% Essigsäure zugesetzt hat.

61. Sublimat und Chlornatrium oder Essigsäure etc. Eine Lösung von 5 Theilen Sublimat und 1/2 Theil Chlornatrium in 100 Theilen Wasser wird wohl als Gaulesche Lösung bezeichnet. — M. Heidenhain (Festschrift Kölliker Leipzig 1892 p. 109) empfiehlt eine 1/2 %ige Lösung von Chlornatrium heiss mit Sublimat gesättigt. Sobotta (Arch. Mikr. Anat. 50. Bd. 1897 p. 21) aber warnt nachdrücklich vor der „kolossal schrumpfenden Wirkung namentlich der konzentrirten Kochsalzsublimatlösung“.

Kaiser (Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 363) benutzt 10 g Sublimat, 3 g Eisessig und 300 Wasser, Mingazzini (Ricerche Lab. Anat. Roma Vol. 3 1893 p. 47) 2 Vol. konz. wässerige Sublimatlösung, 1 Vol. Eisessig und 1 Vol. absol. Alkohol. Drüner (Jena. Zeit. Naturw. 28. Bd. 1894 p. 294) fixirt die Hoden von *Salamandra* in Sublimatessigsäure (Eisessig und Sublimat je 1, Wasser 20) oder Sublimatosmiumessigsäure (auf 20 Theile von jener 1 Theil 1 %ige Osmiumsäure). S. auch § 59, 603 und 624 (Eisig).

Auch Sublimat mit Alkohol wird von manchen Autoren empfohlen, so wohl zuerst von Frenzel (§ 62); neuerdings von Apáthy (Mikrotechnik 1896 p. 111) eine Lösung von 3—4 g und 1/2 g Kochsalz in 100 ccm 50 %igem Alkohol.

Held (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. 1897 p. 227) verwendet zum Fixiren von Nervengewebe eine „1 proc. Lösung von Sublimat in 40 proc. Aceton“ und wäscht die Objekte dann „durch langsam steigende Acetonlösungen“ aus.

62. Sublimat und Salpetersäure nach Gilson (neueste Vorschrift von 1895, sonst nicht publizirt): Salpetersäure von 46° (also etwa 1.456 p. sp. oder 80 %) 78 ccm, Eisessig 22 ccm, Sublimat 95—100 g, 60 %iger Alkohol 500 ccm, Wasser 4400. (Diese Proportionen scheinen unnöthig genau zu sein und dürfen gewiss variirt werden.)

Für Seethiere setze man einige Kristalle von Jod hinzu, um die Niederschläge der Seesalze zu verhindern. Sollten aber die Präparate dennoch körnige Niederschläge zeigen, die vielleicht von reichlichen Phosphaten in den Geweben herrühren, so wasche man mit Wasser und etwas Jodtinktur.

Ich habe dieses Gemisch probirt und finde, es fixirt im Allgemeinen zart und treu, verleiht auch den Geweben eine vorzügliche Konsistenz. Die Objekte können ohne Schaden lange darin bleiben, und insofern ist es namentlich Anfängern sehr zu empfehlen. Auch dringt es sehr leicht ein. Die Objekte färben sich hinterher stets sehr gut. Legt man Eier von Batrachiern einige Tage hinein, so lässt sich die Gallertschicht leicht entfernen. Für einige Objekte verstärkt man übrigens mit Vortheil den Gehalt an Sublimat.

Frenzel (Arch. Mikr. Anat. 26. Bd. 1886 p. 232) verwendet eine halbgesättigte Lösung von Sublimat in 80 %igem Alkohol. Zum Fixiren setzt er ihr auf je 1—2 ccm 1 Tropfen Salpetersäure zu, lässt die Objekte 5—10 Minuten darin, bringt sie darauf in die nicht angesäuerte Lösung und von ihr später direkt in 90 %igen Alkohol.

63. Sublimat und Pikrinsäure nach Rabl (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 165): gesättigte Lösung von Sublimat in Wasser und von Pikrinsäure in Wasser je 1 Theil, Wasser 2 Theile (s. § 578).

Mann (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 480) löst in einer gesättigten Lösung von Sublimat in Kochsalzlösung (von 0.75 %) 1 % Pikrinsäure und nach Belieben auch 1 % Tannin. Ferner verwendet er (Anat. Anzeiger 8. Jahrg. 1893 p. 441) auch ein Gemisch von 100 ccm absol. Alkohol, 4 g Pikrinsäure, 15 g Sublimat, 6—8 g Tannin; letzteres soll die zu starke Härtung verhüten.

vom Rath (Anat. Anzeiger 11. Bd. 1895 p. 286) nimmt von kalt gesättigter Lösung von Pikrinsäure und heiss gesättigter Lösung von Sublimat (beide in Wasser) gleiche Theile, dazu $\frac{1}{2}$—1 % Eisessig, fixirt die Objekte darin mehrere Stunden lang und bringt sie direkt in Alkohol.

Das **Pikrin-Sublimat-Osmium-Gemisch** desselben Autors wird aus dem vorigen durch Zusatz von 10 % einer 2 %igen Osmiumsäurelösung hergestellt. Ueber Mann's Sublimat mit Osmiumsäure s. oben p. 25.

64. Gemisch von Fish (citirt nach Kingsbury in: Trans. Amer. Micr. Soc. Vol. 17 1896 p. 143, 293): 1 g Pikrinsäure, 5 g Sublimat, 10 g Eisessig, 1 Liter Wasser.

65. Gemisch von Foà (citirt nach: Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 37 1895 p. 287): gleiche Theile einer gesättigten Lösung von Sublimat in Normalsalzwasser und von Müllers Gemisch oder von 5 %iger Lösung von Kaliumbichromat.

Warum diese Gemische so zusammengesetzt sind, leuchtet nicht ein. Die Chromsalze darin sind der Färbung mit Karminen oder Hämateïngemischen nicht günstig.

66. Gemisch von Zenker (Münch. Med. Wochenschr. 24. Jahrg. 1894 p. 534, citirt nach Mercier in: Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 471; dort auch genauere Gebrauchsanweisung): 5 % Sublimat und 5 % Eisessig werden in Müllers Gemisch gelöst. Man fixirt darin mehrere Stunden, wäscht mit Wasser aus und behandelt entweder die Stücke in toto oder die Schnitte mit Jodalkohol. S. auch Retterer in: Journ. Anat. Phys. Paris 33. Année 1897 p. 463. — Ueber das Gemisch von Kultschitzky s. oben § 53.

67. Platinchlorid. Ein äusserst werthvolles Mittel, wurde ursprünglich von Rabl zum Studium der Karyokinese verwendet, kann aber allgemein empfohlen werden. Rabl gebraucht eine wässerige Lösung von 1:300, lässt die Objekte 24 Stunden darin, wäscht sie mit Wasser aus, härtet sie in Alkohol und schneidet sie; er färbt mit Delafields Hämateïngemisch oder mit Safranin.

Platinchlorid wirkt ähnlich dem Goldchlorid, schwärzt aber nicht wie dieses die Objekte. Nach Rabl ist es zum Studium der Karyokinese besser als irgend ein anderes Mittel mit Ausnahme der Chromameisensäure (§ 44). Die Chromatinfäden schrumpfen ein wenig, und so werden die Pfitznerschen Körner und die Längstheilung der Fäden sehr deutlich (Morph. Jahrb. 10. Bd. 1884 p. 216).

Platinchlorid zerfliesst äusserst leicht, und man sollte es daher in Lösung beziehen; eine 10 %ige ist im Handel zu haben.

Merkels Gemisch (Chromsäure und Platinchlorid) s. § 52, Rabls **Platin-Sublimatgemisch** § 578.

68. Platinosmiumessigsäure oder **Hermanns Gemisch.** Hermann (Arch. Mikr. Anat. 34. Bd. 1889 p. 58) erhielt ausgezeichnete Resultate, als er in Flemmings starkem Gemisch (§ 47) die Chromsäure durch 1 %iges Platinchlorid ersetzte und die übrigen Bestandtheile entweder unverändert liess oder von der Osmiumsäure nur die Hälfte nahm. Also:

15 Theile 1 %ige Platinchloridlösung, 1 Theil Eisessig und 4 (oder nur 2) Theile 2 %ige Osmiumsäure. So wurden die Plasmastrukturen besser konservirt als mit Flemmings Gemisch: in letzterem schlägt ja leider die Chromsäure gewisse Eiweissstoffe in den Geweben als Fäden oder Netze nieder (§ 40), die oft sehr regelmässig erscheinen und feine Strukturen vortäuschen; Platinchlorid thut das nicht.

Nachbehandlung und Tinktion wie bei Flemmings Gemischen. Auch die Bemerkungen über das Verderben des Gemisches durch Verdunsten der Osmiumsäure (§ 47) gelten hier in gleichem Maasse.

Meine vielen Erfahrungen mit Hermanns Gemisch gestatten mir das Urtheil, dass es die Objekte weniger färbt und mitunter auch zarter fixirt, als Flemmings Gemische. Da es aber letzteren nicht immer überlegen und so sehr theuer ist, so liegt, glaube ich, kein guter Grund dafür vor, es im Allgemeinen an die Stelle von Flemmings Gemischen treten zu lassen.

Ueber Niessings Modifikationen s. unten § 633.

69. Palladiumchlorid. Es wird in Lösungen von 1:300 oder 600 oder 800 nur 1—2 Minuten lang angewandt. Nach Cattaneo (Boll. Sc. Pavia 1883 No. 3 u. 4) ist es für Infusorien das beste Fixirmittel. Die Gewebe von höheren Thieren bräunt es.

Das Salz kommt im Handel fest vor. Man löst 10 g in 1 Liter Wasser unter Zusatz von 4—6 Tropfen Salzsäure; die Lösung nimmt 24 Stunden in Anspruch. Frenkel (Anat. Anzeiger 8. Jahrg. 1893 p. 538) empfiehlt für Bindegewebe ein Gemisch von 15 Theilen 1 %iger Lösung von Palladiumchlorid, 5 Theilen 2 %iger Osmiumsäure und einigen Tropfen Essigsäure.

70. Eisenchlorid nach Fol (Zeit. Wiss. Z. 38. Bd. 1883 p. 491). Die Tinct. ferri perchlorati [1]) der englischen Pharmakopoe. mit Wasser auf etwa 2 % verdünnt, dient zum Fixiren von marinen Infusorien, etwas stärker hingegen zum Fixiren von allerlei Arten schwimmender Seethiere (Medusen, Salpen, Heteropoden etc.). Man wäscht zunächst mit neutralem, dann zur Auflösung des Eisensalzes mit angesäuertem (etwas Salzsäure) 70 %igem Alkohol aus (oder lässt das Eisen in den Geweben und bringt es durch Zusatz einer Spur von Gallussäure zum Alkohol erst recht zur Geltung). — Später (Lehrbuch p. 102) empfiehlt Fol zum Fixiren von Cilien und Pseudopodien, aber auch von pelagischen Seethieren, die obige Tinktur mit dem 5—10fachen Volumen an 70 %igem Alkohol zu verdünnen (falls ein Niederschlag auftritt, etwas Salzsäure hinzufügen!) und die damit fixirten Objekte, die aber nur recht klein sein dürfen, in 50 %igem Alkohol mit 1/2—1 % Oxalsäure auszuwaschen.

---

[1]) Sie besteht aus 1 Maasstheil der „strong solution of Perchloride of Iron“ (spec. Gewicht = 1.44) und 3 Maasstheilen 85 %igem Alkohol; ihr spez. Gewicht muss 0.992 sein. [M.]

Mir scheint, dies Gemisch hat zu viele Mängel, um ausser für ganz spezielle Fälle empfehlenswerth zu sein. — Den Liquor ferri der deutschen Pharmakopoe, mit der 3—4fachen Menge von Alkohol oder Wasser verdünnt, nimmt Platner (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 187) zum Fixiren von markhaltigen Nerven.

Ueber **Kupferchlorid** s. § 74, über **Iridiumchlorid** im Nachtrag § 883.

C. Organische Säuren oder ihre Salze. Jod.

71. Essigsäure. Der Ehrenplatz unter den organischen Säuren in ihrer Eigenschaft als Fixirmittel gehört wohl mit Recht diesem alten Reagens. In der 1. Auflage der englischen Ausgabe dieses Werkes hiess es nur, sie und Ameisensäure „sind nützliche und wohlbekannte Fixirmittel für die Kerne. Nach Flemming, der sich speziell mit ihnen beschäftigt hat, wirkt (Zellsubstanz p. 380) sie am besten in einer Stärke von $^1/_5$—1 $^0/_0$. Eine 5 $^0/_0$ige oder noch stärkere Säure hebt die Kernstrukturen anfänglich klar hervor, bringt sie aber dann zum Schwellen und Verblassen, und dies gilt von den schwächeren Lösungen nicht (ibid. p. 103)“. Jetzt hingegen muss konstatirt werden, dass durch E. van Beneden die starke Säure als ein mitunter sehr werthvolles Fixirmittel für gewisse Objekte überall eingeführt worden ist. Besonders eignet sie sich für sehr kontraktile Thiere, wie viele Würmer, Cölenteraten und Nudibranchier: sie tödtet sie äusserst rasch und neigt dazu, sie ausgestreckt zu fixiren. Im Allgemeinen verfährt man dabei so: man giesst Eisessig in reichlicher Menge über die Thiere, lässt sie davon durchdringen — das muss in 5—6 Minuten geschehen sein, denn die starke Säure dringt sehr leicht ein — und wäscht sie dann in immer stärkerem Alkohol unter häufigem Wechsel desselben aus. Einige Forscher fangen mit Alkohol von 30 $^0/_0$ an, aber dieser kommt mir etwas schwach vor, man sollte 70 $^0/_0$igen oder wenigstens 50 $^0/_0$igen nehmen.

Im Traité d. Méth. techn. von 1887 gab ich an, Eisessig werde deswegen nur so selten angewandt, weil er die feineren Strukturen nicht getreu konservire. Ich glaube aber jetzt, dass man unter Beachtung der obigen Regeln, speziell soweit sie den Eisessig und das Auswaschen mit einigermaassen starkem Alkohol betreffen, im Allgemeinen auch feinere Einzelheiten leidlich gut konservirt finden wird. Allerdings lange nicht so gut wie durch Sublimat oder Chromosmiumessigsäure, die aber die nachtheilige Eigenschaft haben, nicht so rasch einzudringen, daher mitunter gar nicht zu brauchen sind, wo der Eisessig noch leicht Verwendung findet. Ich sehe auch keinen Grund

ein, warum andere energische Reagentien nicht mit Essigsäure kombinirt werden sollten. Dr. L. Johnson (in litt.) hat als eins der besten Mittel für die Fixirung der Retina ein Gemisch von gleichen Theilen Eisessig und 2 %iger Osmiumsäure ausprobirt. Lo Bianco (Mitth. Z. Stat. Neapel 9. Bd. 1890 p. 443) fügt zur konzentrirten[1]) Säure $^1/_{10}$ einer 1 %igen Chromsäure und findet, dass sogar diese geringe Menge erheblich der erweichenden Wirkung der Essigsäure entgegenarbeitet (seine Chromessigsäure No. 2; s. auch § 43).

72. Essigsäure und Alkohol (Carnoy in: La Cellule Tome 3 1887 p. 6; ibid. p. 276. van Beneden & Neyt in: Bull. Acad. Belg. (3) Tome 14 1887 p. 218. Zacharias in: Anat. Anzeiger 3. Jahrg. 1888 p. 24. van Gehuchten ibid. p. 237). Carnoy giebt für dies wichtige Mittel zwei Formeln an: Eisessig 1 Theil, absoluter Alkohol 3 Theile; und: Eisessig 1 Theil, absoluter Alkohol 6 Theile, Chloroform 3 Theile. Das Chloroform soll die Wirkung des Gemisches beschleunigen. (Carnoy & Lebrun setzen neuerdings noch Sublimat zu; s. § 633). — van Beneden & Neyt nehmen gleiche Theile absoluten Alkohol und Eisessig. — Zacharias verwendet Eisessig 1 Theil, absoluten Alkohol 4 Theile, und auf je 10 ccm dieses Gemisches 2—3 Tropfen 1 %iger Osmiumsäure (van Gehuchten findet diesen Zusatz überflüssig).

Essigsäure und Alkohol bilden eines der raschesten und am besten eindringenden Gemische. Es konservirt die Kerne ausgezeichnet und erlaubt auch ausgezeichnete Färbungen von jedweder Art. Erdacht wurde es von allen obigen Autoren eigens zum Studium der Karyokinese in den Eiern von *Ascaris* — diese sind als schwierig zu fixirendes Objekt sprichwörtlich geworden — ist aber für alle Objekte zu brauchen, die im vorigen Paragraphen erwähnt worden sind. Man wäscht sie mit Alkohol aus und behandelt sie dann nach Belieben weiter; jedoch thut man gut daran, Wasser nach Möglichkeit zu vermeiden. Ueber Essigsäure, Alkohol und Sublimat s. § 61.

73. Ameisensäure lässt sich verdünnt ebenso gebrauchen wie Essigsäure (§ 71). Vielleicht könnte man sie konzentrirt gleichfalls an die Stelle der Essigsäure treten lassen, aber mir sind keinerlei Versuche hierüber bekannt.

[1]) Die Autoren sind bei der Angabe ihrer Vorschriften nur selten so genau, wie zu wünschen wäre; dies ist auch mit der Essigsäure der Fall. Eisessig ist die 100 %ige Essigsäure, während die konz. Essigsäure der deutschen Pharmakopoe nur 96 % enthält. Was Lo Bianco (Mitth. Z. Stat. Neapel 9. Bd. 1890 p. 441) im Gegensatze zum Eisessig als konzentrirte Essigsäure bezeichnet, ist aber nur die nahezu 49 %ige mit dem spez. Gewicht von 1.060. [M.]

74. Kupferacetat und Kupferchlorid oder Gemisch von Ripart & Petit (Carnoy, Biol. cellulaire 1884 p. 94): Kampherwasser (nicht gesättigt) 75, dest. Wasser 75, Eisessig 1, Kupferacetat und Kupferchlorid je 0,30 g.

Dies Gemisch fixirt sehr gemässigt und zart. Ich meine, es härtet Objekte, die in Balsam gebracht werden sollen, nicht genug, ist aber häufig vorzüglich und zuweilen unentbehrlich für Objekte, die man so frisch wie möglich in wässerigen Medien untersuchen möchte; solche färben sich augenblicklich und vorzüglich mit Methylgrün. Zur Erhöhung der fixirenden Kraft kann man dem Gemisch Osmiumsäure zusetzen. Für cytologische Untersuchungen ist es geradezu unschätzbar. Der Kampher kann übrigens durch einen Kristall von Thymol ersetzt werden.

75. Uranacetat nach Schenk (Mitth. Embr. Inst. Wien 2. Bd. 1882 p. 95; Gilson in: La Cellule Tome 1 1885 p. 141). Es kommt in seinen Eigenschaften der Pikrinsäure sehr nahe, fixirt zart und dringt sehr gut ein, ist also vielleicht für Arthropoden gut. Auch giebt es mit Methylgrün keinen Niederschlag. S. auch oben p. 26.

76. Jod. Es dringt sehr gut ein und härtet beträchtlich. Nach Kent (Manual of the Infusoria 1881 p. 114; Journ. R. Micr. Soc. London (2) Vol. 3 1883 p. 730) wirkt es auf Infusorien fast genau so wie Osmiumsäure und mitunter sogar noch besser ein. Kent nimmt eine konzentrirte Lösung von Jodkalium in destillirtem Wasser, sättigt sie mit Jod, filtrirt und verdünnt sie bis zur Farbe von tiefbraunem Wein. Zum Wasser mit den Infusorien braucht man davon nur sehr wenig zuzusetzen. Oder man nimmt Lugols Gemisch (Wasser 100, Jodkalium 6, Jod 4 Theile).

Jod tödtet die Zellen sehr rasch, ohne ihre Form zu verändern. Mir hat es beim Studium der Spermatozoen sehr gute Dienste geleistet. Leider kenne ich kein Farbgemisch, das sich mit Jod vertrüge.

Sehr kleine Objekte kann man nach Overton (Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 14) durch **Joddämpfe** plötzlich fixiren. Jodkristalle erhitzt man in einem Reagensrohre, bis Dämpfe aufsteigen, dann neigt man das Rohr und lässt die schweren Dämpfe über den Objektträger mit den Objekten darauf hinströmen. Man muss ihn dann aber 2—3 Minuten lang auf etwa 40° C. erwärmen, um das Jod wegzuschaffen, und kann nun die Objekte einschliessen oder sonstwie weiter behandeln. — Ueber **Jodalkohol** zum Fixiren von Radiolarien s. § 878.

77. Pikrinsäure. Die Pikrinsäure in wässeriger Lösung muss stark angewandt werden, wenn man die Elemente in situ erhalten will, da schwache Lösungen maceriren; schwache sind also gut für Dissoziationen oder zum Fixiren isolirter Zellen. Nach Flemming erhalten aber beiderlei Arten die Kernfiguren gleich gut. Gewöhnlich

nimmt man eine kalt gesättigte[1]) Lösung (etwa 1 : 75, heisses Wasser löst bedeutend mehr) und lässt die Objekte je nach der Grösse einige Sekunden bis 24 Stunden darin; für Infusorien genügen 1—2 Minuten, während Objekte von mehreren Millimetern Dicke 3—6 Stunden brauchen.

Die Säure muss stets mit Alkohol ausgewaschen werden, denn Wasser schadet den mit ihr behandelten Geweben. Deswegen vermeide man auch bei allen übrigen Manipulationen das Wasser und färbe in alkoholischen Flüssigkeiten (Parakarmin, Boraxkarmin, Hämakalcium), mit alleiniger Ausnahme der wässerigen Färbemittel, die selber etwas härten, wie Hämalaun, Karmalaun u. s. w. Dagegen ist einer der Vortheile der Pikrinsäure der, dass sie aus jeglichem Gewebe mit Alkohol sicher entfernt werden kann, wenn man nur lange genug damit wäscht.

Nach Jelinek (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 242) geht die Pikrinsäure viel leichter aus den Geweben heraus, wenn man dem Alkohol eine Base zusetzt. Er giebt einige Tropfen konz. wässeriger Lösung von Lithiumkarbonat zum Alkohol; ein leichtes Präcipitat entsteht, und wenn man nun in den trüben Alkohol die Objekte bringt, so wird er wieder in dem Maasse, wie die Pikrinsäure ausgezogen wird, klar und gelb. Man fährt damit fort, bis die Gewebe nicht mehr gelb sind.

Was die Pikrinsäure so wichtig macht, ist die Leichtigkeit, mit der sie eindringt; sie ist daher besonders werthvoll für Chitinthiere.

Sehr oft, ja vielleicht sogar immer, verwendet man vortheilhaft die Pikrinsäure nicht allein, sondern ein Gemisch mit Schwefelsäure (nach Kleinenberg) oder mit Salpeter- oder Salzsäure (nach Mayer). Ueber Pikrinsäure und Alkohol s. § 85.

78. Pikrinschwefelsäure (Kleinenberg in: Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 19 1879 p. 208; Mayer in: Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. 1880 p. 2 und in: Amer. Natural. Vol. 16 1882 p. 698). Unter Pikrinschwefelsäure ohne näheren Zusatz verstehe ich das Gemisch, wie es Mayer bereitet, nämlich destill. Wasser 100 und konz. Schwefelsäure 2 Maasstheile, zu sättigen mit Pikrinsäure (es lösen sich nur etwa 0,25 g, also viel weniger als in destill. Wasser); man mag, um jede Konfusion

[1]) Behrens (Tabellen 2. Aufl. p. 33) giebt an, 100 ccm lösen 0,6 g Pikrinsäure. Ich finde, bei 20° C. lösen sie über 1 g. Um sicher zu gehen, sollte man eine Lösung von bestimmtem Gehalte verwenden; ich habe (Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 24) eine 1/2 %ige vorgeschlagen. [M.]

zu vermeiden, dies auch die konzentrirte (oder unverdünnte) Pikrinschwefelsäure nennen. Dagegen verstehe ich unter Kleinenbergs Gemisch das von Kleinenberg (l. c.) angegebene, das man am besten durch Verdünnung der konzentrirten Pikrinschwefelsäure mit dem dreifachen Volumen destillirten Wassers erhält.

Kleinenberg fügt zu 100 Raumtheilen einer gesättigten Pikrinsäurelösung in Wasser 2 Raumtheile Schwefelsäure hinzu, filtrirt von dem reichlichen Niederschlag ab und verdünnt dann mit dem dreifachen Volum Wasser. Ferner empfiehlt er den Zusatz von so viel Kreosot aus Buchenholztheer, wie sich lösen will, und neuerdings (Zeit. Wiss. Z. 44. Bd. 1886 p. 25) auch von 2 % Chlornatrium, um Schrumpfungen bei den Larven von *Lopadorhynchus* zu vermeiden. Das Kreosot soll Schwellungen verhüten. Nach Fol (Lehrbuch p. 100) lässt sich dies durch Zusatz von 1/3 Volum 1 %iger Chromsäure erzielen. — Wistinghausen (Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1891 p. 47) hingegen fügt zu 100 Vol. gesättigter Lösung von Pikrinsäure 300 Vol. Wasser und 2 Vol. Schwefelsäure, behält also alle Pikrinsäure im Gemisch.

Von obigen zwei Gemischen wird gewöhnlich das von Kleinenberg angewandt und das stärkere nur für spezielle Objekte, besonders Arthropoden benutzt. Ich möchte hier aber gleich hervorheben, dass diese Praxis mir irrig vorkommt, denn das Kleinenbergsche ist viel schwächer, als gewöhnlich gut ist, und sollte daher gerade für spezielle Fälle, z. B. embryologische Untersuchungen — es wurde für die an *Lumbricus* erfunden — reservirt bleiben, während das starke generell verwendet werden müsste, so ganz besonders bei Seethieren.

Die Behandlung der Objekte ist in beiden Fällen gleich: man lässt sie 3, 4 oder mehr Stunden in der Flüssigkeit, bringt sie dann sofort auf 5—6 Stunden in Alkohol von 70 %, endlich in solchen von 90 %, der so oft gewechselt wird, bis die gelbe Farbe ganz verschwunden oder wenigstens viel heller geworden ist. Warmer Alkohol zieht die Säure viel rascher aus als kalter. Natürlich kann man die Schnitte mit alkoholischen Lösungen von Safranin und dergleichen färben.

Held (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. 1897 p. 227) wäscht die Pikrinschwefelsäure aus Nervengewebe entweder zunächst mit fliessendem Wasser oder mit Alkohol von 20, 30 etc. % oder endlich mit Aceton „von gleicher prozentiger Stufe" aus; in letzterem schrumpfen die Objekte weniger als in Alkohol.

Die Vorzüge der Pikrinschwefelsäure bestehen darin, dass sie die Gewebe sehr rasch tödtet, sehr gut eindringt, sich aus den Geweben mit Alkohol völlig entfernen lässt (viel leichter als die reine Pikrinsäure), sie auch für die Färbung in geeignetem Zustande lässt und, soweit Seethiere in Frage kommen, die Salze des Seewassers aus ihnen wegschafft.

Sie hat aber auch manche Nachtheile. Bei Vertebraten muss sie mit Vorsicht angewandt werden, denn die Schwefelsäure bringt das Bindegewebe zum Quellen. Für Gewebe mit viel Kalk ist sie nicht zu empfehlen, denn sie löst ihn und schlägt ihn dann als Gipskristalle darin nieder (s. § 79). In zahllosen Fällen veranlasst sie Quellungen und Macerationen. Für zarte, wässerige Organismen, wie Medusen, ist sie ein Gräuel. Auch bei cytologischen Untersuchungen sollte man sie vermeiden, denn sie wirkt auf Plasma und Kern oft nachtheilig ein. Im Ganzen finde ich, dass sie wohl für Arthropoden werthvoll ist; für den allgemeinen Gebrauch hingegen scheint sie mir eines der am meisten überschätzten Reagentien zu sein, die je auf Grund einer Autorität in Gunst kamen.

79. **Pikrinsalpetersäure** nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. 1880 p. 5): Wasser 100, Salpetersäure von 25% N_2O_5 5 Volumina, dazu Pikrinsäure bis zur Sättigung.

Wird unverdünnt angewandt. Wirkt ganz ähnlich der Pikrinschwefelsäure und gewährt den Vortheil, dass sich kein Gips bildet, hat dagegen den Nachtheil, dass sie sich nur viel langsamer auswaschen lässt. Nach Mayer (Whitman, Methods p. 22) konservirt sie Eier mit viel Dotter, z. B. von *Palinurus*, besser als Salpetersäure, Pikrinsäure oder Pikrinschwefelsäure es thun.

80. **Pikrinsalzsäure** nach Mayer (ibid.): Wasser 100, Salzsäure von 25% HCl 8 Volumina, dazu Pikrinsäure bis zur Sättigung. Wird unverdünnt angewandt und wirkt ähnlich der Pikrinsalpetersäure.

81. **Pikrinchromsäure** s. § 51, **Pikrinsublimat** § 60, 63 u. 64.

82. **Pikrinosmiumsäure.** Flemming (Zellsubstanz p. 381) hat Gemische versucht, worin sich an Stelle der Chromsäure in den Chromosmiumgemischen (§ 46 und 47) Pikrinsäure befindet. Die Kerne wurden damit ebenso gut fixirt, färbten sich aber schwieriger. — vom Rath (Anat. Anzeiger 11. Bd. 1895 p. 289) giebt zu 100 ccm gesättigter Lösung von Pikrinsäure 6 ccm einer 2%igen Lösung von Osmiumsäure und 1 ccm Eisessig.

83. **Pikrinplatinchlorid** und **Pikrinosmiumplatinchlorid** nach vom Rath (Anat. Anzeiger 11. Bd. 1895 p. 282, 285). 200 ccm gesättigte Lösung von Pikrinsäure, 1 g Platinchlorid (in 10 ccm Wasser gelöst) und 2 ccm Eisessig; eventuell dazu 25 ccm einer 2%igen Lösung von Osmiumsäure.

84. **Pikrinessigsäure** nach Boveri (Jena. Zeit. Naturw. 21. Bd. 1887 p. 423). Konz. Lösung von Pikrinsäure 100, Wasser 200, Eisessig 3 Raumtheile. S. auch § 603. — Bouin (Arch. Anat. Micr. Paris Tome 1 1897 p. 229) fixirt die Hoden von *Cavia* mit einem Gemisch von 15 Theilen gesättigter Pikrinsäurelösung, 5 Theilen Formol und 1 Theil Essigsäure.

85. **Pikrinsäure und Alkohol** nach Gage (Proc. Amer. Soc. Micr. Vol. 12 1890 p. 120; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1891 p. 418): Alkohol von 95% und Wasser je 250, Pikrinsäure 1 Theil. Man fixire darin etwa 24 Stunden lang, wasche ebenso lange in Alkohol von 67—70% und dann noch 24 Stunden lang in Alkohol von 75—82%. S. auch § 63.

D. Andere Fixirmittel.

86. Alkohol. Zum Fixiren wird der Alkohol im Allgemeinen nur in 2 Stärken mit Vortheil gebraucht: als sehr schwacher und als absoluter. Letzterer gehört unter die Fixirmittel, weil er so rasch tödtet und härtet, dass die Gewebe bei der unvermeidlichen energischen Entwässerung ihre Form nicht mehr ändern können. Schwacher Alkohol andererseits gehört auch hierher, weil er gerade noch energisch genug koagulirt und zugleich in Folge seines Wassergehaltes nur schwach und unschädlich entwässert. Die Stärken dazwischen erfüllen diese Bedingungen nicht und sind daher an und für sich zum Fixiren nicht geeignet, können aber in Verbindung mit anderen Fixirmitteln (Sublimat, Salpetersäure) dadurch sehr nützlich werden, dass sie ihr Vermögen, leicht in die Gewebe einzudringen, bedeutend erhöhen. Hierfür ist 70 %iger am besten.

Es wird lange nicht genug darauf geachtet, ob der Alkohol auch rein sei. Für gewöhnliche Zwecke — um ganze Thiere zu konserviren etc. — mag nicht viel darauf ankommen, wohl aber, wenn es sich um die Erforschung histologischer Feinheiten handelt. Reiner Alkohol darf beim Abdampfen nur äusserst wenig festen Rückstand liefern, darf zwischen den Händen verrieben nach seiner Verdunstung keinen starken Geruch hinterlassen, darf endlich weder sauer noch alkalisch reagiren. (Man prüfe die Reaktion mit empfindlichem Lakmuspapier, das man eventuell einige Stunden darin liegen lässt.)

Da der Alkohol, den man zum Auswaschen benutzt, aus den Geweben nicht nur die Fixirgemische, sondern auch Bestandtheile der Gewebe selber auszieht, so muss er häufig gewechselt werden; auch wenn er schon ganz klar und farblos bleibt, ist es gut, ihn nochmals zu wechseln, ehe man die Objekte längere Zeit darin aufhebt. Beim Gelingen mancher subtiler Färbungen spielt die Qualität des Alkohols eine grössere Rolle, als man gewöhnlich glaubt (s. auch Mayer in: Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1891 p. 180, wo ein Mittel zur Prüfung angegeben ist: eine Lösung von je 1 g Hämateïn und Chloraluminium in 100 ccm Alkohol darf, im Verhältniss von 1:100 dem zu prüfenden Alkohol zugesetzt, auch nach 24 Stunden noch nicht ausgefällt sein).

87. Drittel-Alkohol oder Ranviers Alkohol besteht nach Ranvier (Traité 1. Ed. 1875 p. 241; 2. Ed. 1888 p. 68) aus 2 Theilen Wasser und 1 Theil Alkohol von 90 % (nicht absolutus, wie ich irrthümlich in der 1. Auflage angegeben und an mehreren Orten kopirt gefunden

habe). Der Alkohol muss aber genau diese Stärke haben, denn seine Wirkung hängt davon wesentlich ab. Man lässt die Objekte 24 Stunden darin, länger nur, wenn man sich um die nach dieser Zeit eintretende Maceration nicht zu kümmern braucht. Man färbt zweckmässig mit Pikrokarmin, Alaunkarmin oder Methylgrün.

Der Drittel-Alkohol ist ein sehr mildes Mittel. Er härtet so wenig, dass er sich nur selten für Objekte eignet, die geschnitten werden sollen. Hauptsächlich dient er für rasche Macerationen.

Tabelle zum Verdünnen des Alkohols nach Gay-Lussac.

Sie giebt an, wie viele Raumtheile Wasser man zu 100 Raumtheilen Alkohol von der ursprünglichen Stärke (in der Tabelle rechts) setzen muss, um die gewünschte Stärke (in der Tabelle links) zu erhalten. Z. B. um Alkohol von 60⁰/₀ zu machen, muss man zu 100 ccm von 90⁰/₀igem nahezu 54 ccm Wasser setzen, zu 100 ccm von 70⁰/₀igem nur reichlich 17 ccm.

Gewünschte Stärke in Prozenten	Ursprüngliche Stärke in Prozenten								
	90	**85**	**80**	**75**	**70**	**65**	**60**	**55**	**50**
85	6·56								
80	13·79	6·83							
75	21·89	14·48	7·20						
70	31·05	23·14	15·35	7·64					
65	41·53	33·03	24·66	16·37	8·15				
60	53·65	44·48	35·44	26·47	17·58	8·76			
55	67·87	57·90	48·07	38·32	28·63	19·02	9·47		
50	84·71	73·90	63·04	52·43	41·73	31·25	20·47	10·35	
45	105·34	93·30	81·38	69·54	57·78	46·09	34·46	22·90	11·41
40	130·80	117·34	104·01	90·76	77·58	64·48	51·43	38·46	25·55
35	163·28	148·01	132·88	117·82	102·84	87·93	73·08	58·31	43·59
30	206·22	188·57	171·05	153·61	136·04	118·94	101·71	84·54	67·45

88. Absoluter Alkohol. Er ist ebenfalls sehr werthvoll, denn er konservirt die Kernstrukturen gut, was vom Drittel-Alkohol nicht gilt. Ferner dringt er viel besser ein als dieser, ja, er gehört sogar zu den am besten eindringenden Mitteln. Nach Mayer (Mitth. Z. Stat.

Neapel 2. Bd. 1880 p. 7) bietet siedender absoluter Alkohol oft die einzige Möglichkeit, um gewisse Arthropoden so rasch zu tödten, dass die Maceration vermieden wird, die mit kaltem Alkohol eintreten würde (speziell bei Tracheaten). S. auch § 612 (Brüel).

Wichtig ist es, zum Fixiren relativ viel Alkohol zu verwenden. Als gutes Färbmittel dient hinterher Alaunkarmin bei kleinen Thieren. Zum Aufbewahren nehme man Alkohol von 90 % oder weniger.

Der absolute Alkohol, wie er im Handel vorkommt, ist beim Gebrauch fast unmöglich absolut zu halten, da er an der Luft rasch Wasser anzieht. Fol empfiehlt deswegen, ein wenig kaustischen Kalk hinein zu thun, der wenigstens einen Theil der aus der Luft absorbirten Feuchtigkeit anzieht und ausserdem die Säure neutralisirt, die häufig dem käuflichen Alkohol anhaftet. Nach einer anderen Vorschrift hängt man Streifen von Gelatine hinein; man soll sogar gewöhnlichen Alkohol damit absolut machen können, wahrscheinlich aber auch sauer.

Ranvier bereitet ihn sich für die Praxis absolut genug, indem er 95 %igen mit gebranntem Kupfersulfat behandelt: er lässt ihn damit unter öfterem Schütteln 1—2 Tage in Berührung, giesst ihn dann ab, giebt eine neue Menge des Kupfersalzes hinzu, und thut dies so oft, bis dies nicht mehr merklich blau wird, oder bis man beim Vermischen eines Tropfens Alkohol mit ebenso viel Terpentinöl unter dem Mikroskop keine Wassertheilchen mehr sieht. Das Kupfersulfat calcinirt man in einer Porzellanschale über einer Spirituslampe oder einer Gasflamme so lange, bis es weiss wird, und pulverisirt es dann (Proc. Acad. N. Sc. Philadelphia f. 1884 p. 27; Journ. R. Micr. Soc. London (2) Vol. 4 1884 p. 522 und 984).

89. Saurer Alkohol (Mayer in: Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. 1880 p. 7). Zu 97 Vol. 90 %igem Alkohol setzt man 3 Vol. reine Salzsäure und löst ein wenig Pikrinsäure darin auf. In dem Gemisch lässt man die Objekte (Seethiere) nur so lange, bis man sicher weiss, dass sie gut damit durchtränkt sind, und wäscht sie dann in 90 %igem Alkohol aus. Dabei zeigt das Verschwinden der gelben Farbe an, dass alle Säure aus den Objekten entfernt ist.

Das Gemisch soll nur für gröbere Objekte dienen, die man für Museen in Alkohol aufheben will, und die Säure soll dabei sowohl das Verkleben der Organe durch die Körpersäfte, das in neutralem Alkohol oft eintritt, als auch die Bildung von Niederschlägen verhindern, die sich aus dem Seewasser auf die Oberfläche der Objekte abscheiden könnten und dann nicht nur dem Alkohol, sondern auch später den Färbmitteln das Eindringen erschweren würden. Uebrigens verliert die Säure nach einiger Zeit merklich an Kraft, da sich auf ihre Kosten Chloräthyl bildet. Statt des Alkohols von 90 % kann man auch, obwohl nicht so gut, den von 70 % ansäuern. — Lo Bianco (Mitth. Z. Stat. Neapel 9. Bd. 1890 p. 443) verwendet 50 %igen Alkohol mit 5 % Salzsäure.

90. Formaldehyd. Formaldehyd oder Methylaldehyd ist der Name des Gases CH_2O, das durch Oxydation aus Methylalkohol ent-

steht. Eine 40 %ige Lösung davon in Wasser haben Schering & Komp. als Formalin und Meister, Lucius & Brüning als Formol in den Handel gebracht, während eine amerikanische Firma sie Formalose nennt. Wie ich anderswo bemerkt habe (Anat. Anzeiger 11. Bd. 1895 p. 255), wird die schon ansehnliche Literatur über die Anwendung des Formaldehydes für anatomische Zwecke durch den ungenauen Gebrauch jener Ausdrücke recht konfus gemacht: manche Autoren brauchen sie durcheinander, und oft kann man gar nicht herauslesen, ob ein Autor Prozente von Formaldehyd oder von der 40 %igen Lösung meint, was doch gewiss nicht dasselbe ist. Soviel wird man mir aber zugeben, dass man die Stärke der Lösungen am besten entweder auf Formaldehyd bezieht und auch so ausdrückt, oder dass man sagt: Formol (oder Formalin), verdünnt mit so und so viel Wasser. Die gegenwärtig herrschende Konfusion ist höchst unbequem.

Die Lösungen von Formaldehyd sollen sich zuweilen theilweise oder ganz unter Bildung eines weissen Niederschlages von Paraformaldehyd ($C_3 H_6 O_3$) zersetzen. Nach Fish lässt sich dies vermeiden, wenn man die Lösungen in dunkeln Gläsern und im Kühlen aufhebt. Der Dampf von Formaldehyd reizt die Konjunktiva und die Schleimhäute sehr, aber nur vorübergehend, nicht so schlimm wie Osmiumsäure. Man benetze auch die Finger nicht mit den Lösungen, denn Formaldehyd härtet die Haut sehr rasch.

In die histologische Technik wurde der Formaldehyd zugleich von F. Blum (Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 314) und Hermann (Anat. Anzeiger 9. Bd. 1893 p. 112) eingeführt. Blum nahm Formol mit dem 10fachen Volumen Wasser verdünnt (also beinahe 4 % Formaldehyd) und sah dieses Gemisch so voluminöse Organe, wie Leber, Niere, Hirn, rascher härten als Alkohol, fand auch, dass die Schnitte sich gut färbten und die Elemente gut konservirt waren. Hermann nahm eine Lösung von ½—1 % „Formalin“ (aus dem Zusammenhang geht aber hervor, dass er Formaldehyd meint); auch er bemerkte die rasche Härtung, zugleich aber, dass die gehärteten Organe ungefähr ihre Durchsichtigkeit und Färbung wie im Leben beibehielten. Später sind diese Beobachtungen vielfach bestätigt worden, und so steht es jetzt fest, dass für Museen Formaldehyd das werthvollste Mittel zum Präpariren und Konserviren bildet, das seit der Einführung des Alkohols entdeckt worden ist, ja dass es diesem für einige Zwecke

weit überlegen ist (Näheres hierüber bei Blum in: Verh. Anat. Ges. 8. Vers. 1895 p. 236).

In Folge der Konfusion in der Terminologie ist es zur Zeit nicht möglich, die Stärke der Lösungen genau anzugeben, die man bisher für histologische Untersuchungen gebraucht hat. Nur so viel lässt sich sagen, dass sie so gut wie sicher zwischen den von Blum und Hermann angegebenen Grenzen liegen werden, also zwischen $\frac{1}{2}$ und 4 %, wenn das Formaldehyd für sich allein angewandt wird. Nur Hoyer jun. (Verh. Anat. Ges. 9. Vers. 1894 p. 236; Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1895 p. 28) hat das konzentrirte Formol (also 40 % Formaldehyd) verwandt und giebt an, dass sich darin die Gewebe besser halten als in schwachen Lösungen, ja sogar besser als in Sublimat. Indessen waltet hier sicher ein Irrthum ob: ich finde, dass in Präparaten mit $13\frac{1}{3}$ % Formaldehyd (1 Vol. Formol und 2 Vol. Wasser) die Zellen enorm überfixirt sind und so homogen aussehen wie osmirte Zellen (§ 39).

Eigene Versuche mit Lösungen von 2—4 % Formaldehyd haben mir ferner gezeigt, dass gleich jener starken Lösung auch diese dem Zellplasma ein homogenes, colloides Aussehen verleihen, zugleich aber die Gewebe beträchtlich zum Quellen bringen. Bei 2 % ist die Vacuolisirung sehr stark. So bin ich zum Schlusse gekommen, dass der Formaldehyd allein durchaus ungeeignet für cytologische Untersuchungen ist, auch nicht dazu gebraucht werden sollte, und so möchte ich ihn nicht einmal für allgemein morphologische Arbeiten benutzen.

Dagegen fixiren nach meiner Erfahrung Gemische von 1 Theil Formol und 2 Theilen 1 %iger Chromsäure, wozu noch 4 % Eisessig kommen, oder von 1 Theil Formol mit 4 Theilen 1 %igem Platinchlorid und 2 % Eisessig ausgezeichnet, sogar in einigen Beziehungen besser als Flemmings oder Hermanns Gemisch.

Auch Gemische mit Alkohol sind empfohlen worden, so von Lavdowsky (Anat. Hefte 1. Abth. 4. Bd. 1894 p. 355) folgende beiden:

1. Wasser 40, 95 %iger Alkohol 20, Formol 6, Eisessig 1 Theil;
2. Wasser 30, „ 15, „ 5, „ 1 Theil.

Graf (New York State Hospitals Bull. 1897) empfiehlt in einer vorläufigen Mittheilung besonders für Hirudineen das Pikro-Formalin, d. h. Gemische von Formol und Pikrinsäure (nachher Auswaschen mit Alkohol von 30 %). S. auch § 84.

Ueber das Härten mit Formaldehyd s. § 109 und speziell für das Centralnervensystem s. § 685 und 750.

S. ferner Plenge (Arch. Path. Anat. 144. Bd. 1896 p. 409), Gerota (Internation. Monatschr. Anat. Phys. 13. Bd. 1896 p. 108; Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 311), L. Blum (Ber. Senckenberg. Ges. Frankfurt f. 1896 p. 285: mehr für makroskopische Zwecke), Fish (Trans. Amer. Micr. Soc. Vol. 17 1896 p. 319) und Stroud (Amer. Natural. Vol. 31 1897 p. 92) sowie unten § 109. Ueber die Wirkung des Formols auf Proteïnstoffe: Gelatine, Eiweiss etc. s. Benedicenti (Arch. Anat. Phys. Phys. Abth. 1897 p. 219).

5. Kapitel.

Härtmittel.

91. Einleitung. Ueber die Nothwendigkeit des Härtens und seine Ausführung ist schon oben § 31 und 32 die Rede gewesen. Hier sollen nun einige Mittel besprochen werden, die besonders für langsames Härten geeignet sind, viel weniger hingegen für das rasche Härten, das mit dem Fixiren verbunden ist. Gleichzeitig soll gezeigt werden, wie man einige von den oben beschriebenen Fixirmitteln zu langsamem Härten benutzen kann. Dagegen wird hier die ganz spezielle Frage nach dem Härten des Centralnervensystems nur berührt und ausführlich erst bei den neurologischen Methoden behandelt.

A. Mineralsäuren.

92. Chromsäure. Sie wird gewöhnlich in der Stärke von $^1/_5$ bis $^1/_2$ % gebraucht, dafür aber einige Tage bis einige Wochen lang, je nach Grösse und Art des Objektes. Schleimhäute z. B. sind in einigen Tagen hart genug, das Gehirn dagegen erfordert Wochen.

Man muss grosse Mengen der Lösung nehmen; wenigstens 200 ccm auf ein Stück von etwa 1 ccm (Ranvier).

Zur Erzielung von wirklich guten Resultaten sollte man keine grösseren Stücke härten wollen als etwa von 15 ccm (1 Kubikzoll). Das Rückenmark eines Menschen erfordert 2 Liter Lösung, und diese muss nach einigen Tagen gewechselt werden, auch dauert die Härtung 6—8 Wochen.

Man beginne mit einer schwachen Lösung und verstärke sie erst nach einiger Zeit. Sobald die Stücke die richtige Härte erreicht haben, nehme man sie heraus, sonst werden sie brüchig. Man mag sie dann bis zur weiteren Verwendung in Alkohol (von 95 %) aufheben, jedoch wäscht man sie am besten vorher 24—48 Stunden lang in Wasser aus. So viel ich weiss, setzt man gern der Härtlösung

etwas Glycerin zu und erzielt hierdurch nicht nur weniger Brüchigkeit, sondern, wie ich meine, auch weniger Schrumpfung.

Man lese nach, was oben § 41 über die Wirkung des Lichtes auf die Objekte in Alkohol gesagt ist. Weitere Einzelheiten siehe in den speziellen Paragraphen.

Chromsäure ist ein sehr mächtiges und schnelles Mittel: man erreicht durch sie schon in wenigen Tagen einen Härtegrad, den man z. B. mit Bichromaten kaum in ebenso vielen Wochen erreichen würde. Aber sie hat leider die unangenehme Eigenschaft, die Objekte brüchig zu machen.

93. Chromsäure und Alkohol nach Pritchard (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 13 1873 p. 427): Chromsäure 1, Wasser 20, 84 %iger Alkohol 180 Theile. Man löse die Chromsäure vorher in dem Wasser und setze dies zum Alkohol (bei direkter Lösung der Chromsäure im Alkohol würde die Reaktion zu heftig werden). Die Lösung wird bald braun [1]; sollte sie nach einigen Tagen halb gelatiniren, so muss man sie neu machen. Zur Härtung der Retina, Cochlea etc. ist sie besonders geeignet; Zeit etwa 1 Woche bis 10 Tage.

94. Chromosmiumsäure (Flesch). **Chromosmiumessigsäure** (Flemming). Beide Gemische können auch für langsames Härten gebraucht werden und leisten Vortreffliches. Von Flemmings Gemischen eignet sich besonders das schwache. Siehe im Uebrigen § 45 und 46. Bei zarten Objekten erzielt man vielleicht noch günstigere Resultate mit Merkels **Chromsäure und Platinchlorid** (§ 102).

Ueber **Chrompikrinsäure** s. § 51, **Osmiumsäure** und **Salpetersäure**, die beide wohl nur für Nervengewebe angewandt werden, siehe dort.

B. Chromate.

95. Allgemeines. E. Burckhardt, der speziell die Konservirung des Zellkerns durch Bichromate studirt hat (La Cellule Tome 12 1897 p. 335), unterscheidet die kernzerstörenden (die Alkalisalze, ferner das Ammonium, Magnesium, Strontium und Zincum bichromicum) und die kernerhaltenden (das Barium-, Calcium- und Kupfersalz). In Müllers Gemisch scheint das Natriumsulfat die Wirkung des Bichromats auf den Kern abzuschwächen. Das Zinksalz bildet den Uebergang von der 1. Gruppe zur 2., die aber vom Kerne auch nur das Chromatin konservirt. Zum besseren Eindringen muss Essigsäure zugesetzt werden,

---

[1]) Eine ganz thörichte Vorschrift: das Gemisch reagirt schon nach kurzer Zeit nicht mehr sauer, und dann wirkt also nur noch der Alkohol. Siehe auch § 50 Anm. [M.]

und um deren schädliche Wirkungen auf das Cytoplasma abzuschwächen, ein Salz der 1. Reihe; daraus resultirt als Gemisch zum Fixiren von Plasma und Kern die Kombination von: Bar. bichrom. 4 %ig 60 Vol., Kal. bichrom. 5 %ig 30 Vol. und Eisessig 5 Vol. (Das Bariumsalz kann auch durch 4 %iges Calcium- oder 6 %iges Kupferbichromat ersetzt werden.) Nimmt man Chromsäure 1 %ig 60 Vol., Kal. bichrom. 5 %ig 30 Vol., Eisessig 5 Vol., so wird auch die achromatische Figur gut erhalten. Weniger gut sind Gemische der 2. Gruppe mit Platinchlorid und Eisessig oder mit Sublimat und Eisessig, von denen Burckhardt mehrere angiebt.

96. Kaliumbichromat. Dies ist vielleicht das wichtigste aller Härtmittel sensu stricto. Es härtet langsam, viel langsamer als Chromsäure, verleiht aber den Geweben eine unvergleichlich bessere Konsistenz und macht sie auch bei ganz langer Einwirkung nicht so spröde. In der That dürfen sie ihm ohne viel Schaden fast unbegrenzt lange ausgesetzt werden.

Die Stärke der üblichen Lösungen variirt von 2—5 %. Wie bei der Chromsäure, so ist es auch hier äusserst wichtig, mit schwachen Lösungen zu beginnen und erst allmählich zu stärkeren zu greifen. Zur Härtung des Auges eines Schafes braucht man mit Lösungen, die von 2 % auf 4 % steigen, etwa 3 Wochen. Ein Rückenmark erfordert 3—6 Wochen, ein Gehirn wenigstens ebenso viele Monate.

Nach der Härtung muss man die Objekte vor dem Einlegen in Alkohol sorgfältig mit Wasser auswaschen. Am besten stellt man sie mit dem Alkohol ins Dunkle (§ 41). Will man aber eine gute Färbung mit Karmin erzielen, besonders mit Ammoniakkarmin, das sich für so gehärtete Stücke vom Nervensystem vorzüglich eignet, so darf man die Objekte vor dem Färben auch nicht einen Augenblick in Alkohol bringen.

Man färbt entweder mit einem Karmin- oder mit einem Hämateïngemisch.

Die mit Kaliumbichromat behandelten Objekte haben eine hässlich gelbe Farbe, die sich mit Wasser nicht auswaschen lässt. Nach Warlomont (Bull. Soc. Belg. Micr. Tome 11 1885 p. 201) geht sie heraus, wenn man einige Minuten mit 1 %igem Chloralhydrat wäscht, indessen ist dies nach Gierke den Geweben schädlich. S. übrigens § 40 Anmerkung.

Böhm & Oppel (Taschenbuch 3. Aufl. 1896 p. 22) fixiren sowohl mit Kaliumbichromat als auch mit Müllers Gemisch (§ 97) im Dunkeln.

97. Müllers Gemisch: Kaliumbichromat 2—2 ½ g, Natriumsulfat 1 g, Wasser 100 ccm. Man lässt es ebenso lange einwirken wie das reine Kaliumbichromat. Es war früher ungemein beliebt, scheint aber neuerdings viel weniger gebraucht zu werden. Ich vermuthe, die Superiorität dieses Gemisches über jenem ist nicht illusorisch. Nach Fol ist es für Embryonen von Säugethieren, für die es empfohlen worden sei, werthlos.

98. Erlickis Gemisch (Warschauer Med. Zeit. 22. Jahrg. No. 15 und 18; Progrès médical 1877 No. 39): Kaliumbichromat 2 ½ g, Kupfersulfat 1 g, Wasser 100 ccm. Der Zusatz des Kupfersulfates ist verständlich: es härtet ja selber ziemlich energisch und mag daher das immerhin träge Bichromat verstärken. Jedenfalls härtet dieses Gemisch sehr viel rascher als das Müllersche oder die einfache Lösung des Bichromates: ein Rückenmark braucht nur 4 Tage, allerdings bei der Wärme eines Brütofens, und nur 10 Tage bei gewöhnlicher Temperatur (Fol, Lehrbuch p. 106). Ich halte es für eins der besten Härtmittel für voluminöse Objekte. Menschliche Embryonen von einigen Monaten können bequem darin gehärtet werden.

Stücke vom Centralnervensystem, die in Erlickis Gemisch gehärtet worden sind, zeigen oft dunkle Flecken mit unregelmässigen Ausläufern ähnlich Ganglienzellen. Man hat sie früher als krankhafte Gebilde betrachtet, weiss aber nun, dass es Niederschläge sind. Sie lassen sich durch Waschen mit heissem Wasser oder mit ganz verdünnter Salzsäure, oder indem man die Stücke vor dem Ueberführen in Alkohol mit ½ %iger Chromsäure behandelt, wegschaffen (Tschisch in: Arch. Path. Anat. 97. Bd. 1884 p. 173; Edinger in: Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 245).

99. Kaliumbichromat, Osmiumsäure und Platinchlorid nach Johnson (Vorschrift von 1895 nach privater Mittheilung von Dr. L. Johnson): 2 ½ %ige Lösung von Kaliumbichromat 70, 2 %ige Lösung von Osmiumsäure 10, 1 %ige Lösung von Platinchlorid 15, Essig- oder Ameisensäure 5 Theile.

Man nehme nicht mehr Platinchlorid, als hier vorgeschrieben, denn sonst bilden sich in den Geweben leicht Kristalle. Henneguy, der dies Gemisch nach seinen vielen Erfahrungen damit sehr rühmt, sagt (Leçons sur la cellule. Paris 1896 p. 61), man füge am besten die Essig- oder Ameisensäure erst kurz vor dem Gebrauche zu, da sie häufig das Osmium und Platin von selbst so reduzire, dass das Gemisch ganz schwarz werde.

Das Gemisch wurde zur vorläufigen Härtung der Retina erdacht, sollte nur 2 Stunden einwirken und dann durch reine Lösung von Kaliumbichromat ersetzt werden. Indessen ist es auch auf andere Gewebe vortrefflich anwendbar. Die Osmiumsäure hat den Zweck, das Härtvermögen des Gemisches zu erhöhen. Dr. Johnson schreibt mir darüber, sie verkürze die Zeit zur Härtung sehr, da man eine Retina schon in 3 Tagen zum Schneiden fertig in Celloidin eingebettet haben könne.

Oben § 54 habe ich schon darauf hingewiesen, dass man dies Gemisch auch zum Fixiren brauchen könne, manchmal sogar mit sehr gutem Resultate. Henneguy sagt (l. c.), es kontrahire das mehr spongiöse Protoplasma weniger als Flemmings Gemisch, erzeuge auch nicht, wie letzteres oft thue, trügerische Niederschläge.

Ich glaube, für einige Zwecke (z. B. feine Untersuchungen über Plasmastrukturen) wird es gut sein, weniger Essig- oder Ameisensäure zu nehmen.

100. Bichromate und Alkohol. Die Lösung von Kalium- oder Ammoniumbichromat kann mit Alkohol versetzt werden und wirkt dann rascher. So nimmt Hamilton zum Härten von Gehirnen 1 Theil 90 %igen Alkohol und 3 Theile Müllers Gemisch (s. § 684; ferner § 53 das Gemisch von Kultschitzky). Während des Härtens müssen die Präparate im Dunkeln stehen.

101. Ammoniumbichromat. Nach der Literatur darüber zu urtheilen ist dies doppeltchromsaure Salz sehr in Gunst, warum aber, ist mir nicht recht klar. Es wirkt ganz ähnlich dem Kalisalze. Fol giebt an, es dringe etwas rascher ein und härte etwas langsamer. Es muss aber in etwas stärkeren Lösungen, bis zu 5 %, gebraucht werden. — **Ammoniummonochromat** (das einfach chromsaure Salz) wird von einigen Forschern vorgezogen und in der nämlichen Stärke verwandt. Klein (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 18 1878 p. 319) empfiehlt es für den Darm, den es in 5 %iger Lösung in 24 Stunden härtet.

C. Chloride und andere Substanzen.

102. Platinchlorid und Chromsäure (Merkels Gemisch). Die Formel für dieses sehr gute Mittel ist schon § 52 gegeben worden. Es ist besonders gut für zarte Objekte. Merkel lässt es auf Retina 3—4 Tage einwirken; Eisig schreibt für Anneliden 3—5 Stunden vor und bringt die Objekte dann in Alkohol von 70 %; für kleine Hirudineen findet Whitman 1 Stunde genug und nimmt dann Alkohol von 50 %.

Whitman (Methods p. 153) empfiehlt zur Härtung von Fischeiern ein anderes Gemisch (ich glaube nach Eisig), nämlich gleiche Theile von 1/4 %igem Platinchlorid und 1 %iger Chromsäure. Die Eier bleiben 1—2 Tage darin.

103. Palladiumchlorid nach F. E. Schulze (Arch. Mikr. Anat. 3. Bd. 1867 p. 477). Schulze empfahl es theils, weil es den Geweben eine bessere Konsistenz verleihe als Chromsäure oder Müllers Gemisch, theils weil es Organe mit vielem Bindegewebe besonders leicht durchdringe. Es färbt gewisse Bestandtheile der Gewebe in verschiedenen Tönen von Braun. Die etwas lange Gebrauchsanweisung lese man im Original nach.

104. Zinkchlorid. Gilson (La Cellule Tome 6 1890 p. 122) empfiehlt ein Gemisch aus je 5 Theilen Eisessig und Salpetersäure, 20 Theilen Chlorzink, 100 Theilen Alkohol von 80% und 300 Theilen Wasser.

Ueber Zinkchlorid für das Gehirn s. unten § 684 und 685. **Bleiacetat** ebenfalls, s. § 681.

105. Pikrinsäure härtet für sich allein nur wenig und wird selten gebraucht. Man verwende sie in konzentrirter Lösung. Dagegen in Gemischen ist sie nützlich, da sie deren Eindringvermögen erhöht. Ueber Pikrinchromsäure s. § 51, über Pikrinsäure und Alkohol § 85.

106. Jod mag in Verbindung mit Alkohol durch sein grosses Eindringvermögen gute Dienste leisten. Ueber die Methode von Betz zum Härten des Gehirns s. § 705.

107. Pyridin. Nach Souza (C. R. Soc. Biol. Paris (8) Tome 4 1887 p. 622; Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 65) härtet, entwässert und hellt es zu gleicher Zeit auf. Nachher färbt man mit Theerfarben, die in Pyridin gelöst sind, oder man bringt die Gewebe erst in Wasser und färbt sie dann in gewohnter Art. Es härte rasch und sei besonders gut für Gehirne, löse aber das Myelin (überhaupt Fett) auf.

108. Alkohol. Für sich allein ist er zum Härten weniger geeignet als die meisten oben besprochenen Mittel, braucht man ihn aber mit Verstand, um die Wirkung eines guten Fixirmittels zu vervollständigen, so leistet er sehr gute Dienste. Am besten verwendet man 90- oder 95 %igen, oft aber ist schwächerer, bis zu 70 %, nöthig. Absoluter ist selten anzurathen. Man beginne mit schwachem und verstärke ihn allmählich, nehme auch immer grosse Mengen und wechsle ihn oft oder hänge das Objekt oben in der Flüssigkeit auf, sodass es stets von reinem Alkohol umgeben bleibt, während das Wasser und die Extraktivstoffe des Objektes sich zu Boden senken. Zum Härten grosser Stücke braucht man oft viele Wochen, während kleine, leicht

durchdringbare, wie Schleimhäute, schon in 24 Stunden hart genug werden können.

109. Formaldehyd (Formol, Formalin, Formalose). Hierüber ist zum Theil schon oben im § 90 gehandelt worden. Als Härtmittel sensu stricto ist es am wichtigsten für das Nervensystem (Näheres s. § 685 und 750).

F. Blum härtete grosse Stücke von Leber, Niere, Magen, Gehirn etc. in einer Lösung, die 4 % Formaldehyd enthielt, viel rascher als in Alkohol und fand sie ausgezeichnet erhalten. Nach Hermann war ein so grosses Organ wie ein Kalbherz in einer 1/2—1 %igen Lösung in 12—24 Stunden hart; ganze Augen wurden in der 1 %igen Lösung nach 24 Stunden so hart, dass man sie mit dem Messer wie einen Apfel halbiren konnte. Allerdings ergab sich ihm dabei der Nachtheil, dass die so gehärteten Gewebe, wenn sie zum Entwässern in Alkohol kamen, litten. (Die oben § 90 citirte Schrift von H. enthält auch interessante Beobachtungen über die Konservirung der Farben und des frischen Aussehens der mit Formaldehyd behandelten Objekte.)

In einer Rekapitulation sagt Blum (Anat. Anzeiger 9. Jahrg. 1894 p. 229), sehr voluminöse Stücke werden rasch und ohne Schrumpfung gehärtet, färben sich auch gut. Die Zellen und Kerne behalten ihre Form bei, die Karyokinesen werden fixirt. Schleim werde nicht ausgefällt, sondern bleibe durchsichtig, Fett werde nicht gelöst; die Mikroorganismen geben die ihnen spezifischen Farbreaktionen.

Ueber Grad und Art der Härtung mit Formaldehyd drücken sich die Autoren leider nicht bestimmt aus. So weit ich selbst sehe, werden die Gewebe elastisch, nicht brüchig. Wahrscheinlich schwankt dies aber beträchtlich nach den Geweben.

Für lange Härtung muss man viel Flüssigkeit nehmen und sie von Zeit zu Zeit wechseln. Denn das Formaldehyd verbindet sich mit den Geweben, und so wird die Lösung allmählich immer schwächer.

Hoyer jun. (Verh. Anat. Ges. 9. Vers. 1894 p. 236) bringt die Objekte (1 ccm grosse Stücke) aus dem konzentr. Formol auf 12—24 Stunden in Alkohol und bettet sie in Paraffin ein. Allegcr (Proc. Amer. Micr. Soc. Vol. 15 1894 p. 192) bringt sie aus dem 2--10 %igen (oder auch stärkeren) Formol in Alkohol von 50--70 % und bettet sie ebenfalls in Paraffin ein.

F. Blum (Anat. Anzeiger 11. Bd. 1896 p. 718) tritt dafür ein, dass höchst wahrscheinlich bei der Einwirkung von Formaldehyd auf Eiweiss Methylenverbindungen resultiren, die in Wasser unlöslich sind. Er empfiehlt besonders, kleine Stücke in 4 %iges Formol auf 6—8

Stunden einzulegen, sie dann auf ebenso lange Zeit in absoluten Alkohol zu bringen, nachher auf 1—2 Stunden in Alkohol mit Aether, endlich auf einige Stunden in eine Celloidinlösung; nun werden sie auf Stücke Kork aufgeklebt und, eben fest, in ein Gemisch von schwachem Spiritus und Formol (Genaueres wird nicht angegeben) gelegt, wo das Celloidin erhärtet. So kann man schon in 24 Stunden ein frisches Objekt schneidfähig machen. Von der Verwendung des Formols zum rascheren Gefrieren nach Plenge (Arch. Path. Anat. 144. Bd. 1896 p. 409) räth Blum als überflüssig und komplizirt ab.

Orth (Berliner Klin. Wochenschr. 1896 No. 13; Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 316) empfiehlt zum Härten ein Gemisch von 1 Theil Formol und 10 Theilen Müllerschem Gemisch. Nach mehreren Tagen verdirbt dies aber und muss daher stets frisch bereitet werden. — Ueber Formol mit Pikrinsäure s. oben § 84.

Formol für makroskopische Präparate. Kaiserling (Arch. Path. Anat. 147. Bd. 1897 p. 396) fixirt die Organe von höheren Thieren in einem Gemisch von 40 ccm Formalin, 200 ccm Wasser, 3 g Kaliumnitrat und 6 g Kaliumacetat 1/2 bis mehrere Tage lang, bringt sie dann zur Wiederherstellung der Farbe des Blutes auf kurze Zeit in Alkohol von 80% und hebt sie in einem Gemisch von 20 g Glycerin, 10 g Kaliumacetat und 200 ccm Wasser auf. Sehr grosse Organe injizirt er mit einem Gemisch von 5 g Kaliumacetat, 3 g Kaliumnitrat, 40 ccm Formalin und 100 ccm Wasser. Die Präparate dienen zwar wesentlich makroskopischen Demonstrationen, sollen aber auch sonst einigermaassen brauchbar sein. — Aehnlich verfährt Melnikoff-Rasvedenkoff (Compt. Rend. Tome 124 1897 p. 238), verwendet aber zuerst 10%iges Formol mit Schwefelwasserstoff (oder mit Wasserstoffhyperoxyd, essigsauren Salzen, Hydrochinon etc.), dann Alkohol, zuletzt Glycerin mit Kaliumacetat.

Ueber Formol zum Härten der Gelatine s. unten § 152, des Celloidins § 160.

6. Kapitel.

Entfernen des Alkohols durch Vorharze.

110. Allgemeines. Als Vorharze mögen die Flüssigkeiten bezeichnet werden, deren Funktion es ist, den Alkohol aus den Objekten zu entfernen, damit entweder das Harz, worin die fertigen Präparate gewöhnlich aufbewahrt werden, oder das Paraffin (beim Einbetten) eindringen könne. Meist sind es ätherische Oele oder Kohlenwasserstoffe, und um obigen Ansprüchen zu genügen, müssen sie sich sowohl mit Alkohol als auch mit den Harzen und Balsamen oder dem Paraffin klar mischen. Sie haben allermeist in Folge ihrer starken Lichtbrechung auch die Eigenschaft, die Gewebe durchsichtig zu machen, indem sie zwischen deren gleichfalls stark brechende Bestandtheile eindringen, und heissen daher gewöhnlich Aufhellmittel. Indessen ist ein solches auch jedes Harz, ferner das Glycerin, und man darf daher beide Begriffe nicht mit einander verwechseln, sondern muss sagen: nicht alle Aufhellmittel sind Vorharze, und nicht alle Vorharze hellen zugleich auf. Letzteres gilt z. B. vom Chloroform, das zwar eins der besten Vorharze ist, indessen das Licht nicht stark genug bricht, um die Präparate ganz aufzuhellen.

Man hat es früher für durchaus nöthig gehalten, die Objekte vor dem Einschluss in Balsam aus dem Alkohol erst in ein ätherisches Oel zu bringen, um sie aufzuhellen; dabei hat man ganz übersehen, dass das Aufhellen gewissermaassen nur eine Nebenwirkung bei diesem Vorgange darstellt, und dass es allein darauf ankommt, das Objekt von dem Alkohol zu befreien, der sich nicht mit dem Balsam klar mischt. (Der venetianische Terpentin gestattet es übrigens, die Objekte direkt aus dem Alkohol ohne Aufhellen definitiv einzuschliessen, s. § 442.) Es lohnte sich wohl, auch für das Verdrängen des Alkohols durch die Vorharze eine kurze Bezeichnung zu schaffen, etwa (nach Analogie von entwässern) entspriten. Apáthy (Mikrotechnik p. 74) nennt die Vorharze Vormedien, indessen ist dieser Ausdruck nicht prägnant genug.

111. Praxis des Entfernens des Alkohols. Es ist wichtig, hier trotz der damit verbundenen Wiederholung nochmals zu zeigen, wie man

beim Verdrängen des Alkohols verfährt. Früher nahm man einfach das Objekt aus dem Alkohol und brachte es auf dem Vorharze in einem Uhrglas zum Schwimmen. Das war falsch, denn der Alkohol entwich in die Luft meist rascher, als das Vorharz eindrang, mithin musste das Objekt schrumpfen. Um dies zu vermeiden oder ganz zu verhüten, macht man es gewöhnlich nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. 1880 p. 23) oder Giesbrecht (Z. Anzeiger 4. Jahrg. 1881 p. 483) so, dass man den Alkohol ganz allmählich durch das Vorharz ersetzt. Und zwar so: man füllt in einen kurzen Glastubus so viel Alkohol, dass er die Objekte bedecken kann (ein Uhrglas thut es oft auch, aber ein Tubus ist besser). Mit einer Pipette lässt man nun unter den Alkohol sorgfältig die nöthige Menge des Vorharzes fliessen (oder man giesst umgekehrt den Alkohol sorgfältig auf letzteres) und giebt dann die Objekte in den Alkohol. Sie sinken darin sofort bis zur unteren Grenze des Alkohols, erst nach einiger Zeit aber kommen sie auf dem Grunde des Tubus an. Man glaube aber ja nicht, sie seien vollständig vom Vorharze durchdrungen, bevor sich nicht die Schlieren, die sich durch die Mischung der beiden Flüssigkeiten bilden, vollständig verzogen haben; und erst dann mag man die Objekte mit einer Pipette herausholen oder den oben schwimmenden Alkohol absaugen und sie im Tubus lassen, bis sie gebraucht werden. S. auch § 4.

Alle Vorharze dringen in der Wärme leichter ein.

Oft wird das ätherische Oel, womit die Objekte im Uhrglase oder auf dem Objektträger behandelt werden, nach kurzer Zeit wolkig und wirkt dann nicht mehr gut. Dies beruht auf dem Niederschlage von Wasserdampf aus der Luft auf dem Oel, und die Trübung lässt sich meist durch Erwärmen entfernen (wie W. H. Jackson im Z. Anzeiger 12. Jahrg. 1889 p. 630 angiebt), aber das gelingt nicht immer, denn bei sehr feuchter Atmosphäre, namentlich am Meeresstrande, bleibt sie trotz langen Erwärmens bestehen. Deswegen rathe ich, wenn irgend möglich, stets dazu, sich flacher, gut verkorkter Tuben zu bedienen, denn alsdann kommt es nur selten vor. Auch athme man ja nicht auf das Vorharz.

112. Eintheilung der Vorharze. Neelsen & Schiefferdecker (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. f. 1882 p. 204) haben zahlreiche ätherische Oele aus der rühmlichst bekannten Fabrik von Schimmel & Komp. in Leipzig untersucht, um ein nicht zu theures Mittel zu finden, das den Alkohol rasch aus den Objekten verdrängen, aber auch die Theerfarben

und das Celloidin nicht lösen, ferner nicht rasch verdunsten, endlich nicht gar unangenehm riechen sollte. Alle diese Bedingungen nun erfüllten nur 3 Oele und sind deshalb empfehlenswerth: Cedernöl, Origanumöl und Sandelöl. Hierzu kommen dann noch die wenigen Oele, die in den folgenden Paragraphen empfohlen werden.

Es wäre gewiss wichtig, eine genaue Liste der Brechungsindices[1]) der Vorharze zu haben. Leider ist es mir nicht möglich gewesen, sie in zuverlässiger Weise aufzustellen. Cedernöl kommt dem Crownglas nahe — allerdings gilt dies nur von dem an der Luft eingedickten, nicht von dem frischen dünnen, das etwas schwächer bricht — hellt daher beinahe so stark auf wie Kanadabalsam. Zimmtöl hat einen höheren Index, hellt mithin stärker auf als Balsam. Terpentinöl und Bergamottöl haben dagegen viel niedere Indices, und dies gilt erst recht vom Chloroform.

113. Wahl des Vorharzes. Genauere Angaben hierüber, so weit sie nöthig sind, findet man unten in den Abschnitten über die Gewebe und Organe. Hier genügt wohl für den Anfänger der Rath, stets vorräthig zu halten: 1. Cedernöl zu allgemeinem Gebrauch und zur Vorbereitung der Objekte für das Einbetten in Paraffin (s. § 131); 2. Nelkenöl, um feine Objekte zu präpariren (s. § 115) sowie zum

---

[1]) Ich gebe hier die Indices einiger Stoffe, zum grössten Theile nach Behrens, Tabellen z. Gebrauch bei mikr. Arbeiten (2. Aufl. Braunschweig 1892 p. 42 ff.):

Luft	1.000	Gummi arabicum	1.514
Methylalkohol	1.323	Crownglas	1.518
dest. Wasser	1.336	Cedernöl, eingedickt	1.520
Seewasser	1.343	Citronenöl	1.527
Eiweisslösung	1.350	Nelkenöl	1.533
absol. Alkohol	1.367	Kanadabalsam	1.535
Kaliumacetat, konz. Lösung in Wasser	1.370	Kreosot	1.538
Glycerin 1 Th. u. Wasser 1 Th.	1.397	Kolophonium	1.545
Chloroform	1.449	Karbolsäure	1.549
Bergamottöl	1.464	Anisöl	1.557
Paraffinum liquidum	1.471	Anilin	1.580
Olivenöl	1.473	Zimmtöl	1.619
Terpentinöl	1.473	Schwefelkohlenstoff	1.630
Glycerin, konz.	1.473	Tolubalsam	1.640
Rizinusöl	1.490	Monobromnaphthalin	1.660
Benzol	1.497	Schwefel in Schwefelkohlenstoff	1.750
Cedernöl	1.510	Phosphor	1.950
		Diamant	2.420

Ohne Zweifel bezieht sich beim Kanadabalsam die Zahl 1.535 auf das feste Harz, nicht auf seine Lösung in Chloroform oder Xylol, wo sie erheblich kleiner sein wird. [M.]

Arbeiten mit Safranin etc.; 3. Bergamottöl, das schon 90 %igen Alkohol verdrängt und Theerfarben nicht auszieht; endlich 4. Karbolsäure, um sehr unvollständig entwässerte Objekte rasch zu durchtränken. Die speziellen Vorharze für Celloidinschnitte s. § 164 ff.

114. Cedernöl. Dünnflüssig, hell gelb oder grünlich, riecht schwach nach Cedernholz, verdunstet langsam, ändert sich nicht am Licht, mischt sich mit Chloroformbalsam und mit Rizinusöl. Verdrängt bereits 95 %igen Alkohol aus den Objekten ohne Schrumpfung, zieht Theerfarben nicht aus. Celloidinschnitte werden in 5—6 Stunden frei von Alkohol.

Man achte genau auf die Qualität des Oeles. Ich habe eine Probe von der bekannten Firma Rousseau in Paris geprüft: sie war ganz farblos, entfernte aber sogar absoluten Alkohol aus den Objekten selbst nach vielen Tagen nicht. Ich brauche stets das eingedickte Oel, wie es für die Immersionslinsen geliefert wird. Nach meinen Erfahrungen ist es das allerbeste Vorharz beim Einbetten in Paraffin: es schadet den Zellen und zarten Geweben weniger als irgend ein anderes Mittel. S. auch § 624 (Eisig).

115. Nelkenöl. Es ist von Rindfleisch (Arch. Mikr. Anat. 1. Bd. 1865 p. 138) in die Mikrotechnik eingeführt worden. Im Handel kommen sehr verschieden dunkle Sorten vor. Häufig wird empfohlen, für histologische Zwecke nur die helleren zu verwenden. Hierüber ein Wort zur Aufklärung! Sicher nimmt man im Allgemeinen am besten ein helles Oel, falls es rein ist, aber das ist nicht immer leicht zu bekommen. Es geht nämlich mit dem Alter sehr bald von gelb in braun über; wählt man daher helles, so läuft man sehr leicht Gefahr, ein verfälschtes zu bekommen, denn Nelkenöl wird im Handel ungemein oft verfälscht.

Zwei wichtige Eigenschaften des Nelkenöls verdienen hier nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. 1880 p. 25) Erwähnung. Erstens verbreitet es sich nicht leicht über den Objektträger hin, sondern bildet gern sehr hohe Tropfen. In Folge dessen eignet es sich ungemein zur Vornahme feiner Präparationen mit Nadeln. Zweitens macht es die Objekte nach einiger Zeit sehr brüchig, und auch dies ist bei solchen Präparaten oft sehr nützlich. Man kann übrigens beidem durch Zusatz von Bergamottöl entgegenwirken.

Das Nelkenöl löst Celloidin (oder Kollodium) und darf daher ohne besondere Vorsicht nicht für Celloidinschnitte angewandt werden.

Entgegen der Meinung von Schiefferdecker halte ich es für eins der besten Vorharze. Frisches Oel zieht Theerfarben aus den Objekten leichter aus als altes. Man thut gut daran, echtes Oel von beiden Sorten vorräthig zu haben.

116. Zimmtöl. Aehnelt dem Nelkenöl sehr, ist aber meist dünner. Ich empfehle es als ausgezeichnetes Mittel besonders.

117. Bergamottöl. Es hat nach Schiefferdecker (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. f. 1882 p. 206) viele gute Eigenschaften: es verdrängt schon 95 %igen Alkohol aus Objekten oder Celloidinschnitten rasch und löst die Theerfarben nicht, aber der starke Geruch ist unangenehm[1]); es ist so theuer wie Nelkenöl, doppelt so theuer wie Origanumöl und dreimal so theuer wie Cedernöl.[2]) Sch. zieht es dem Nelkenöl vor, stellt es aber hinter die beiden anderen genannten Oele. Ich halte es für sehr werthvoll, bin zwar nicht mit Sch. der Ansicht, dass es besser sei als Nelkenöl, meine aber doch, man sollte es immer bei der Hand haben.

Es bricht das Licht schwächer als Terpentinöl, steht also in der Refraktion unter den gebräuchlichen Oelen am tiefsten.

Nach Suchannek (Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 158) nimmt gebleichtes, farbloses Bergamottöl nicht viel Wasser auf, grünes hingegen bis zu 10 Prozent. Nach van der Stricht (Arch. Biol. Tome 12 1892 p. 741) löst es mit der Zeit die Fetttröpfchen aus gewissen Eiern auf.

118. Origanumöl (Neelsen & Schiefferdecker in: Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. f. 1882 p. 205). Dünn, hell braun, riecht nicht sehr

---

[1]) Mir das Gegentheil. [M.]

[2]) Die Preise schwanken ungemein. So erwähnen Schimmel & Co. in ihrem Bericht vom Oktober 1896, dass 100 Kilo Nelkenöl im Grosshandel 1875 M. 380, dagegen 1896 nur M. 38 kosteten. In ihrer Preisliste vom Herbst 1896 geben sie als Preise für das Kilo an: Bergamottöl 17 und 22, Cedernöl 8 und 12 (eingedickt), Nelkenöl 5 und 6 (hell), Origanumöl 12 (gall.) und 20 (cret.) Mark. Das Cedernöl sei nur deswegen so billig, weil es aus Abfällen von der Fabrikation der Bleistifte destillirt werde (Bericht vom Oktober 1897).

Apáthy (Mitth. Z. Stat. Neapel 7. Bd. 1887 p. 745) verlangt vom Bergamottöl, das er für Celloidin von allen Oelen das beste sein lässt, dass es sich mit 90 %igem Alkohol ganz klar mische; leistet es das nicht, so soll man ihm 5—10 % absoluten Alkohol zusetzen (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 164). — Nach Schimmel & Co. (Bericht vom Oktober 1896) muss es sich in Alkohol von 80 % klar lösen. [M.]

stark, angenehm,[1]) verdunstet nicht sehr rasch, verändert sich nicht am Licht, mischt sich mit Chloroformbalsam und Rizinusöl. Es verdrängt schon 95 % igen Alkohol rasch aus Objekten und Celloidinschnitten, zieht aber die Theerfarben etwas aus.

Uebrigens muss man sich für die Celloidintechnik unbedingt Ol. Origani cretici verschaffen (Spanischhopfenöl), nicht Ol. Origani gallici (nach van Gieson in: Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 482). Die Sorten wirken sehr verschieden auf Celloidinschnitte, daher sorge man für ein gutes Oel. Nach Squire (Methods p. 81) ist das Ol. Origani des Handels nur verfälschtes Oel von weissem Thymus, und was man als Ol. Origani cretici verkauft, wahrscheinlich Majoranöl.[2])

119. Thymianöl. Nach dem Vorgange von Bumpus (Amer. Natural. Vol. 26 1892 p. 80) meint Fish (Proc. Amer. Micr. Soc. Vol. 15 1893 p. 86; Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 503), in den meisten Fällen lasse sich Origanumöl gut, wenn nicht besser, durch Thymianöl ersetzen. Bei der ersten Destillation des Rohöls erhalte man ein röthlichbraunes, das sogenannte rothe Oel; dieses werde durch nochmaliges Destilliren farblos und heisse dann weisses Oel. Das rothe sei aber als Vorharz genau so gut wie das weisse.

120. Sandelöl (Neelsen & Schiefferdecker, citirt oben § 118). Sehr nützlich, aber zu theuer.

121. Terpentinöl. Wird viel zum Entfernen des Paraffins aus den Schnitten benutzt, da es dieses leicht löst, aber mehrere andere Mittel (§ 126) sind hierfür besser. Braucht man es, um aus den Objekten den Alkohol zu verdrängen, so führt es beträchtliche Schrumpfungen herbei und ändert die Zellstruktur mehr als irgend ein mir bekanntes Vorharz, es sei denn, man benutze es, wie in Deutschland für einige Zwecke sehr beliebt, im eingedickten Zustande. Als solches (das sogenannte verharzte Terpentinöl) gewinnt man es, indem man rektifizirtes Terpentinöl in dünner Schicht einige Tage an der Luft stehen lässt. Man braucht dazu das Oel nur in einen Teller zu giessen, diesen so zuzudecken, dass zwar die Luft, aber kein Staub hinzu kann, und es so lassen, bis es dick wie Syrup wird. Terpentinöl hat, wie ich glaube, den niedrigsten Brechungsindex unter den gebräuchlichen Vorharzen mit Ausnahme von Bergamottöl, jedenfalls einen viel geringeren als Kanadabalsam.

---

[1]) Mir unangenehm. [M.]

[2]) Ob das für England gilt, mag dahin gestellt bleiben, in Deutschland aber lässt sich beiderlei Oel unverfälscht haben. Der Geruch ist auch so verschieden, dass man gar nicht recht begreift, wie Majoran-, Thymian- und Origanumöl mit einander verwechselt werden können. Schimmel & Co. geben allerdings für Thymianöl an, dass das weisse in Frankreich mit Terpentinöl (bis zu 50 %) verfälscht werde (Bericht vom Oktober 1895 p. 69). [M.]

122. Karbolsäure (Phenol). Wird am besten in konzentrirter Lösung in Alkohol angewandt und durchdringt augenblicklich sogar sehr wasserhaltige Objekte. Es ist ein sehr gutes Mittel; man vermeidet es aber besser bei weichen Objekten, die man in Balsam einschliessen will, da sie in diesem gewöhnlich durch Exosmose schrumpfen. Dagegen ist es für Celloidinschnitte gut.

123. Gemisch von Gage (Proc. Amer. Soc. Micr. Vol. 12 1890 p. 121; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1891 p. 418): kristallisirte geschmolzene Karbolsäure 2 ccm, Terpentinöl 3 ccm.

124. Kreosot. Es ist von Stieda (Arch. Mikr. Anat. 2. Bd. 1866 p. 430) warm empfohlen worden und hat fast die nämlichen Eigenschaften wie Karbolsäure (§ 122). Man nehme aber Kreosot aus Buchenholztheer; es eignet sich sehr für Celloidinschnitte.

125. Anilin (Anilinöl). Es ist ein ziemlich wichtiges Vorharz, da es viel Wasser aufnehmen kann: das gewöhnliche ist schon für Schnitte aus 70%igem Alkohol verwendbar, und mit besonderer Vorsicht (Suchannek in: Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 156) kann man sogar die Objekte direkt aus Wasser hineinbringen. So wird das Anilin in einigen Fällen bei der Einbettung in Paraffin werthvoll. In der Regel genügt das gewöhnliche Anilin des Handels, einerlei, ob es farblos oder durch Oxydation braun geworden ist. In schwierigen Fällen muss man aber zu ganz wasserfreiem Anilin greifen (seine Herstellung s. bei Suchannek oder in der vorigen englischen Auflage dieses Buches). Man verwendet Anilin hauptsächlich für Celloidinschnitte, oft mit sehr gutem Erfolge.

126. Xylol, Benzol, Toluol, Chloroform sind alle als Vorharze eigentlich zu flüchtig, aber sehr nützlich für Celloidin- oder Paraffinschnitte. Von den drei zuerst genannten Mitteln ist Benzol am flüchtigsten, dann kommt Toluol und zuletzt Xylol (im Verhältniss von 4:5:9, nach Squire, Methods p. 20). Chloroform schadet einigen empfindlichen Tinktionen mit Theerfarben, ist aber sonst sehr gut, da man die Objekte vorher nicht so genau zu entwässern braucht wie bei Anwendung der Kohlenwasserstoffe.

---

7. Kapitel.

Allgemeines über das Einbetten. Paraffin und andere warme Massen.

127. Etwas über Mikrotome. Obwohl es nicht unsere Absicht ist, die verschiedenen Instrumente zum Schneiden zu beschreiben, so sind doch vielleicht einige Worte darüber dem Anfänger willkommen. Zunächst das Gefriermikrotom: so nützlich es dem Pathologen oder auch dem praktischen Arzt sein mag, eben so wenig ist es doch im Allgemeinen für den Zoologen von Bedeutung. Zwar lassen sich damit in kürzerer Frist als mit irgend einem anderen Mikrotome recht dünne Schnitte machen, aber sie sind gewöhnlich nicht recht brauchbar. Die Lage der Theile in dem Schnitte verschiebt sich beim Frieren und noch mehr beim Aufthauen, und Schnittreihen lassen sich natürlich gar nicht damit machen. In gewissen Fällen mag es jedoch von Nutzen sein. Solger wenigstens rühmt es zum Schneiden frischer Speicheldrüsen sehr (Genaueres s. § 179 ff.), aber das sind doch Ausnahmen.

Für die Zoologen handelt es sich also um ein Mikrotom zum Schneiden eingebetteter Objekte. Nun schneidet man bekanntlich die Objekte in Paraffin trocken und häufig mit quergestelltem Messer, die in Celloidin hingegen gewöhnlich nass und stets mit schrägem Messer. In der Regel sind daher die Mikrotome für Paraffinschnitte nicht recht geeignet für Celloidinschnitte, und umgekehrt. Ein gut eingerichtetes Laboratorium sollte mithin beide Arten von Instrumenten besitzen: die einen für Trockenschneiden, die anderen für Schneiden von Celloidin (und anderen Massen) unter Alkohol. Kann man aber nur für eins die Mittel aufbringen, so sollte man jedenfalls eins nehmen, das wenn auch theuer, so doch beiden Arten des Schneidens nach Möglichkeit gerecht würde.

Als ein solches Universalinstrument möchten wir in erster Linie das Schlittenmikrotom von R. Jung in Heidelberg empfehlen, und zwar das mittelgrosse Modell (Nr. 4) mit den neuesten Verbesserungen. Es ist zwar nicht billig, erlaubt aber das Schneiden von Paraffin sowohl mit querem als auch mit schrägem Messer, ebenso das Schneiden von Celloidin, da der Alkohol zum Befeuchten von Messer und Objekt dem Instrumente nicht schadet, wenn es nur nach dem Gebrauche wieder gut gereinigt wird.

Auch die Schlittenmikrotome von A. Becker in Göttingen sind sehr zu empfehlen; wie sich bei ihnen das Schneiden von Celloidin gestaltet, ist uns nicht bekannt.

Eine andere Kategorie von Mikrotomen beschränkt sich auf die Produktion von Schnittbändern durch Paraffin, arbeitet daher nur mit querem Messer und ist mithin nicht universell. Manches Objekt nämlich wird beim Einbetten in Paraffin stellenweise (je nach der Art des Gewebes) so hart, dass es sich zwar mit schrägem Messer noch ohne Mühe schneiden lässt, hingegen mit querem Messer nicht mehr: die Schnitte zerreissen an den Stellen, wo die harten Massen liegen, oder die harten werden durch die dahinter befindlichen weicheren hindurchgedrückt etc. Auf der anderen Seite gewährt diese Art von Instrumenten den Vortheil, dass sie ungemein viel rascher schneiden als die Schlittenmikrotome. Verfügt man also über die Mittel, so kaufe man sich ausser einem Schlittenmikrotom eins für Schnittbänder, und hier wäre in vieler Beziehung zu empfehlen das sogenannte Schaukelmikrotom von Jung. Dieses ist ein verbessertes Cambridge Rocking Mikrotome und hat vor dem englischen so ingeniösen Original eine ganze Anzahl kleiner Vortheile voraus, die sich aus den Bedürfnissen der Praxis ergeben haben. Es theilt mit ihm den prinzipiellen Fehler, dass es keine geraden Flächen schneidet, sondern Stücke eines Cylindermantels. Zwar ist bei kleinen Objekten, wie sie meist dem Zoologen vorkommen, die Krümmung noch so unbedeutend, dass sie vernachlässigt werden darf, indessen wer hierauf Werth legt, möge sich des von Minot angegebenen Instrumentes bedienen. Dieses scheint allerdings an Genauigkeit der Ausführung noch hinter dem Schaukelmikrotom zurückzustehen; wir empfehlen übrigens nicht das von E. Zimmermann in Leipzig, weil es trotz des hohen Preises nicht exakt genug arbeitet, sondern die Form, in der es A. Becker in Göttingen liefert. (Das neueste Modell von Cambridge, das ebenfalls gerade Flächen schneidet, ist uns bisher nur aus der Ankündigung seiner Verfertiger bekannt.)

Auf eine Besprechung der grossen und theueren Instrumente von Giltay und von Strasser glauben wir verzichten zu dürfen. Auch auf verschiedene kleinere, wie das von Hatschek, Schaffer etc., wollen wir nicht näher eingehen, sondern verweisen den Leser auf die Beschreibungen in der Zeit. Wiss. Mikr.

128. Methoden zum Einbetten. Man bettet gegenwärtig ein Objekt nur noch selten bloss deswegen ein, um es aussen mit einer plastischen Masse zu umgeben, die es ohne ihm schädlichen Druck festhalten soll, sodass man beim Schneiden durch die Einbettmasse zugleich Schnitte vom Objekt erhält. Sondern man füllt zugleich mit dieser Masse die natürlichen Hohlräume im Objekte so gut aus, dass alle Organe, ohne Verschiebungen zu erleiden, auf dem Schnitte in situ erhalten bleiben; und nicht nur dies, sondern die Masse soll auch jede Zelle oder sonstiges anatomische Element ausfüllen, damit die Gewebe eine Konsistenz erlangen, die sie sonst nicht haben würden, und die dafür bürgt, dass in den Schnitten auch die kleinsten Theilchen ihre natürliche Lage beibehalten haben. Dieses Ziel nun erreicht man gewöhnlich auf zwei Wegen. Entweder wird das Objekt mit einer Masse durchtränkt, die in der Wärme flüssig ist, kalt hingegen hart — und das

geschieht nach einer der hier als Schmelzmethoden bezeichneten Methoden; oder es wird mit einer Substanz durchtränkt, die zwar in Lösung flüssig genug ist, um einzudringen, dagegen nach Verdunstung oder sonstiger Entfernung des Solvens zugleich mit dem Objekte hart genug wird, um geschnitten werden zu können. Diese Verdampfmethoden lassen sich einfach am Kollodium erläutern: man entwässere irgend ein weiches Gewebe, durchtränke es erst mit Aether, dann mit Kollodium und erlaube zuletzt dem Aether und Alkohol, langsam zu verdunsten, so wird das Gewebe sammt dem Kollodium eine zum Schneiden geeignete Konsistenz annehmen.

In beiden Fällen heisst das Material zum Einbetten die Einbettmasse. Wie schon oben § 6 gesagt, ist die gebräuchlichste und für den Zoologen wohl geradezu die normale Methode die des Einbettens in Paraffin.

129. Manipulationen beim Einbetten. In eine geschmolzene Masse, z. B. Paraffin, kann man auf folgende Arten einbetten. Man macht sich aus Papier ein Kästchen (oder eine Kapsel) und giesst etwas von der flüssigen Masse hinein; sobald diese nun gerade so weit abgekühlt und dicklich geworden ist, dass das Objekt nicht mehr hindurch zu Boden sinken würde, wird es in das Kästchen gebracht und noch so viel von der Masse hinzugegossen, bis es ganz davon umgeben ist. Oder man stellt das Kästchen auf ein Stück Kork, legt das Objekt hinein, fixirt es in seiner Lage durch Stecknadeln, giesst erst jetzt die geschmolzene Masse hinein und zieht die Nadeln heraus, wenn die Masse kalt ist.

In beiden Fällen muss vor dem Schneiden die Papierform von der Masse entfernt werden.

Papierkästchen macht man wie folgt. Ein Stück Papier *ABCD* von der Form, wie sie der Holzschnitt (Fig. 1) angibt, faltet man längs der Linien *ab* und *cd*, klappt die Falten wieder zurück und faltet es längs *ef*. Diese neue Falte lässt man aber bestehen (Fig. 2), schlägt das Dreieck *egi* längs *gi* so um, dass *e* nach *l* zu liegen kommt, verfährt mit dem Dreieck *fhk* ebenso und klappt zuletzt das Stück *CDgh* längs *gh* um (Fig. 3). Nun macht man die nämlichen Operationen am anderen Ende des Papieres, bildet also die Falte *no* (Fig. 2), die Dreiecke *Apa* und *Bcq* etc. Hebt man endlich die Falten *gh* und *no* in die Höhe und drückt die Ecken *i* und *k* (nebst den entsprechenden am anderen Ende) etwas ein, so ist das Kästchen

fertig. Ein Stück Papier von 100 × 60 mm ergiebt, wenn man die Wände 15 mm hoch macht, ein Kästchen mit einer Grundfläche von 30 × 50 mm. Löst man nach dem Erkalten des Paraffins das Papier vorsichtig ab, so kann man dasselbe Kästchen nochmals gebrauchen.

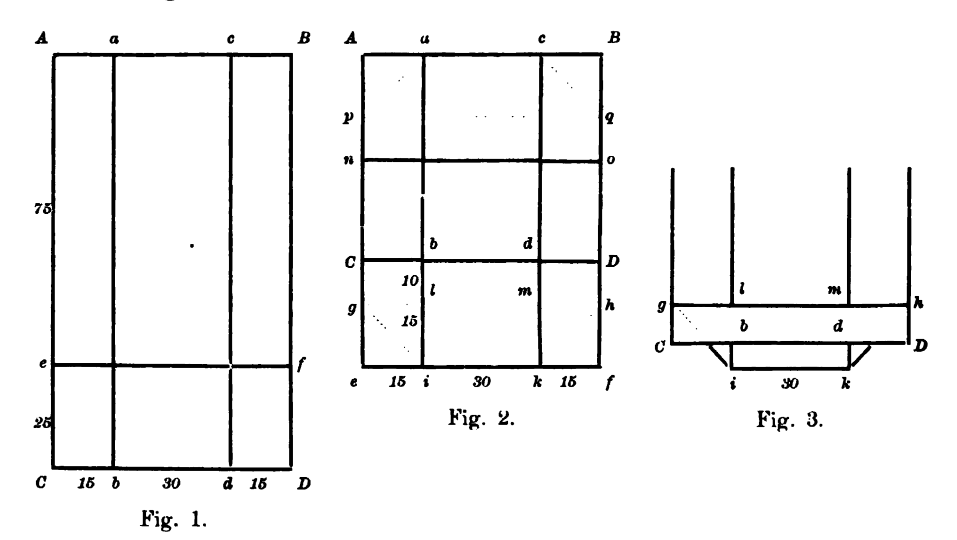


Fig. 1. Fig. 2. Fig. 3.

Zu **Papierkapseln** nimmt man einen guten Kork, windet einen Papierstreifen mehrere Male herum, aber so, dass er auf der einen Seite vorsteht, und steckt eine Nadel durch das Papier in den Kork. Hat man mit Celloidin oder ähnlichen Massen zu thun, so beschwert man den Kork unten mit Blei, damit er nicht schwimmt, wenn er zum Härten in Alkohol oder eine Flüssigkeit gelegt wird.

Am bequemsten sind für Paraffin die **Einbettformen** aus Metall: entweder bestehen sie aus Lettermetall oder aus Messing und haben die Form von zwei rechten Winkeln ; als Boden dient eine Glasplatte, die zuvor ganz dünn mit Glycerin bestrichen (man verreibt einen Tropfen darauf mit dem Finger) und etwas erwärmt wird. Natürlich lässt sich durch Verschieben der beiden Metallstreifen aneinander die Länge des Raumes für das Paraffin variiren, nicht jedoch Breite und Höhe; man kommt aber mit einem Paar Streifen von 1 cm und einem Paar von 2 cm Höhe aus; sie mögen 8 cm lang und 3 cm breit sein. Da sich das Paraffin beim Eingiessen in die Form an den Metallstreifen abkühlt, so fliesst, wenn man es nicht allzu hoch erhitzt hat, nichts davon aus, und man behält doch

in der Regel Zeit genug, um die Objekte in dem noch warmen Paraffin nach Wunsch zu orientiren (am besten parallel den Streifen). Uebrigens thut man auch hier wie bei den Papierkästen gut daran, zunächst reines Paraffin einzugiessen und erst nachher die Objekte hineinzubringen, damit sie nicht unmittelbar auf das Glas zu liegen kommen.

Die Formen aus Messing sind zuerst von Andres, Giesbrecht & Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 4. Bd. 1883 p. 429) beschrieben worden und haben sich gut bewährt. Frankl (Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1897 p. 438) empfiehlt als einfachstes und billigstes Hülfsmittel zum Einbetten geschliffene Glasklötze, die ja recht praktisch sein mögen, jedenfalls aber relativ theuer sind.

Um die Einbettformen paraffindicht zu machen, sodass man die Objekte darin noch beliebig lange Zeit im flüssigen Paraffin belassen kann, bestreicht man nach Mayer (l. c.) die Glasplatte dünn mit Glycerin, legt die beiden Metallstreifen darauf, giesst das so entstandene Kästchen voll Kollodium, leert es aber sofort wieder aus. Dann bleibt nach dem Verdunsten des Aethers eine ganz feine Schicht Kollodium zurück, die kein Paraffin durchlässt. Man muss nur dafür Sorge tragen, dass man die beiden Streifen nicht aus ihrer Lage bringt.

Auch Selenka (Z. Anzeiger 8. Jahrg. 1885 p. 419) hat einen kleinen Apparat zum Einbetten angegeben. Er besteht aus einer in der Mitte zu einem Näpfchen vertieften Glasröhre, durch die sich warmes oder kaltes Wasser leiten lässt; Paraffin und Objekte kommen in das Näpfchen. Der Apparat gestattet es, die Einbettung unter dem Präparirmikroskop vorzunehmen.

Eine Modifikation hiervon beschreibt Andrews (Amer. Natural. Vol. 21 1887 p. 101; Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 375): es ist eine Flasche von rechtwinkligem Querschnitt, mit einem Zu- und Ableitrohr für Wasser; die Flasche liegt horizontal und trägt oben ein Rechteck aus Glasstreifen aufgekittet, in das man das Paraffin giesst. Man lässt erst warmes Wasser durch die Flasche strömen, bis man das Objekt im flüssigen Paraffin orientirt hat, und kühlt es dann rasch ab, indem man kaltes Wasser durchlaufen lässt. S. auch unten p. 81.

Kleine Objekte lassen sich zweckmässig wie folgt einbetten. Das Objekt wird aus dem flüssigen Paraffin genommen, mit Fliesspapier vom überschüssigen Paraffin befreit und auf einen kleinen Paraffinblock gelegt. Dann erhitzt man einen dicken Eisendraht in einer kleinen Flamme und schmilzt damit ein Loch in den Block; endlich schiebt man das Objekt in das geschmolzene Paraffin hinein und legt es darin nach Belieben zurecht. Die Vorzüge dieser Methode bestehen in der

Einfachheit, Schnelligkeit und Sicherheit, womit sie sich ausführen lässt, und sie kann in Folge dessen nicht warm genug empfohlen werden, um so mehr, als sich nach ihr das Objekt auch direkt auf dem Objekthalter des Mikrotoms oder, falls es sehr klein ist, unter dem Präparirmikroskop einbetten lässt.

Endlich wäre noch das **Einbetten in ein Uhrglas** zu erwähnen. Man schmilzt das Paraffin in einem Uhrglase und giebt dann das Objekt hinein, oder man legt das mit dem Vorharze durchtränkte Objekt nebst Stücken von Paraffin hinein und erwärmt hinterher. Jedenfalls lässt man nun die Masse erkalten und schneidet mit einem dünnen, leicht erwärmten Messer das Stück heraus, worin das Objekt sitzt (geht natürlich auch mit Celloidin!). Oder man schiebt erst das ganze Paraffin aus dem Glase heraus und schneidet es dann in die gewünschten Stücke; in diesem Falle thut man gut daran, das Uhrglas vor der Benutzung innen mit einem Minimum von Glycerin (oder Nelkenöl) sorgfältig einzureiben. Für kleine Objekte ist die Methode mit dem Uhrglase nach meinem Urtheil bei weitem die beste.

Ueber die Orientirung der Objekte s. § 136.

Samter (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 469) durchtränkt kleine ungefärbte Objekte, um sie beim Einbetten nicht zu verlieren, mit Paraffin, das vorher mit Alkanna-Extrakt stark roth gefärbt worden ist, und bringt sie beim Einbetten in ungefärbtes Paraffin. Die Objekte selber nehmen die Farbe nicht an. — Rhumbler (ibid. 13. Bd. 1896 p. 303) färbt die ganz kleinen Objekte (Infusorien etc.). aus dem gleichen Grunde schwach mit Eosin (in starkem Alkohol) vor und entfernt dieses aus den Schnitten durch Auswaschen mit schwachem Alkohol. — Borgert (Zeit. Wiss. Z. 63. Bd. 1897 p. 144) lässt ganz reines Paraffin in einem Uhrglase erstarren, bohrt in der Mitte ein kleines Loch bis auf das Glas, giebt in diese Grube die Objekte mit etwas Benzol und setzt das Glas auf kurze Zeit in den Paraffinofen. Das Paraffin löst sich, wenn das Glas innen ganz sauber war, in kaltem Wasser los.

130. Wahl der Methode. Unter den vielen Methoden, die für das Einbetten existiren, ragen zwei besonders hervor: die Paraffinmethode für kleine Objekte und die Celloidin- oder Kollodiummethode für grosse.

Ueber die Vorzüge und Nachtheile dieser beiden wird immer noch debattirt. Indessen scheint mir die Sache sehr einfach zu liegen: Celloidin gestattet lange nicht so dünne Schnitte zu machen, wie sie für ganz kleine Objekte nach den Ansprüchen der modernen Zootomie nöthig sind, und so muss man dann Paraffin nehmen. Auf der anderen Seite kann man in Paraffin sehr dünne Schnitte nur von kleinen Objekten gewinnen; sind letztere schon reichlich über 1 cm

im Durchmesser, so schneiden sie sich in Celloidin ebenso dünn; und wenn sie erst $2^1/_2$ cm im Durchmesser erreichen oder noch mehr, so bekommt man oft in Paraffin überhaupt keine guten Schnitte mehr, da Paraffinblöcke von dieser Grösse unter dem Druck des Messers gerne zersplittern.[1]) Mithin ist für sehr grosse Objekte das Celloidin vorzuziehen.

Ich vermag mich nicht davon zu überzeugen, dass die Gewebe in Celloidin sich besser konserviren als in Paraffin, und so wird es wohl, wie schon gesagt, dabei bleiben müssen: Paraffin für die kleineren, Celloidin für die grösseren Objekte.

In ganz speziellen Fällen leisten auch Gummi oder Gelatine gute Dienste (s. hierüber unten § 171 und 181 ff.).

131. Durchtränken mit einem Vorharze. Das erste Stadium im Einbetten besteht im Durchtränken des gut entwässerten Objektes mit einer Substanz, die ein Solvens des Paraffins ist. Es muss sorgfältig geschehen, wie § 111 vorgeschrieben. Der Vorharze, die hierzu dienen können, sind zahlreiche empfohlen worden: Terpentinöl, Nelkenöl, Bergamottöl, Kreosot, Benzol, Xylol, Toluol, Petroleumäther, Cedernöl, Chloroform und Anilin, nur sind sie nicht alle gleich brauchbar.

Terpentinöl dringt gut ein und mischt sich leicht mit Paraffin. Immerhin empfehle ich es nicht, denn nach meinen Erfahrungen schadet es unter allen Vorharzen der feineren Struktur der Objekte am meisten. Nelkenöl dringt zwar gut ein und schadet den Objekten nicht, mischt sich aber sehr unvollkommen mit Paraffin und macht die Gewebe rasch brüchig. Benzol ist von Brass (Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 301) empfohlen worden, Toluol von Holl (Z. Anzeiger 8. Jahrg. 1885 p. 223), Naphtha (Benzinum petrolei, Steinöl) von Webster (Journ. Anat. Phys. London Vol. 25 1891 p. 278), Petroläther von Field & Martin (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 10). Xylol soll nach M. Heidenhain (Festschr. Kölliker Leipzig 1892 p. 114) die Zellen zum Schrumpfen bringen; er gebraucht Bergamottöl.

C h l o r o f o r m mischt sich gut mit Paraffin und hinterlässt nach

---

[1]) Hiermit bin ich nicht ganz einverstanden. Man muss dann nur weicheres Paraffin nehmen als gewöhnlich. Dass sich wirklich grosse Schnitte auch durch Paraffin erhalten lassen, zeigen die Erfahrungen von Strasser (Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 7), der sogar Serien von Frontalschnitten von 30 μ Dicke durch ein ganzes Menschenhirn (Blöcke von 10 × 15 Ctm. Fläche) macht (siehe § 689). [M.]

dem Verdunsten im Paraffinbade (§ 132) ein reines und sehr homogenes Paraffin, das nur wenig Neigung zum Kristallisiren zeigt. Aber es dringt nicht leicht ein und erfordert deswegen bei etwas grossen Objekten viel Zeit; und man muss es auch durch Verdampfenlassen äusserst sorgfältig entfernen, denn wenn selbst nur eine Spur davon zurückbleibt, so schneidet sich das Paraffin nicht gut. Aber die Entfernung kostet viel Zeit, unter Umständen sogar Tage. Chloroform sollte man daher nur für kleine und leicht durchdringbare Objekte nehmen.

Nach meinen vielen Erfahrungen ist Cedernöl aus den Gründen, die ich anderswo (Z. Anzeiger 8. Jahrg. 1885 p. 563) auseinandergesetzt habe, im Allgemeinen das beste Vorharz zur Einbettung in Paraffin. Es dringt sehr rasch ein, erhält die zarten Gewebe am besten von allen mir bekannten Mitteln, macht die Objekte nicht brüchig, auch wenn man sie Wochen oder Monate lang darin lässt, und gewährt ausserdem noch den Vortheil, dass es selbst bei nicht vollkommener Entfernung aus den Geweben im Wasserbade (§ 132) doch die Schneidfähigkeit des Paraffins nicht ernstlich schädigt; ja, ich glaube, es bessert sie mitunter, indem es die Brüchigkeit verringert. Aber ich brauche stets das eingedickte Oel, wie es für die Immersionslinsen geliefert wird.[1])

Die Methode von Carnoy & Lebrun, um das Brüchigwerden des Dotters beim Einbetten zu verhüten, s. unten § 590.

In einigen schwierigen Fällen (§ 125) ist Anilin zu nehmen. Strasser verwendet für seine Riesenschnitte Karbolxylol (s. § 689).

132. Das Wasserbad für Paraffin. Sind die Objekte mit dem Vorharze gut durchtränkt worden, so wandern sie in geschmolzenes Paraffin.

Einige Autoren legen grossen Werth darauf, den Uebergang vom Vorharze zum Paraffin so langsam wie möglich zu machen, indem sie das Objekt nach einander in verschiedene Gemische von beiden bringen, die bei niedriger Temperatur (etwa 35° C.) geschmolzen bleiben. Das ist aber jedenfalls bei Cedernöl oder Toluol nicht nöthig; hier werden

---

[1]) Mir will dies doch etwas optimistisch vorkommen. Jedenfalls ist das eingedickte Oel kaum leichter aus dem Paraffin zu entfernen als das Chloroform; bleibt aber etwas davon zurück, so dürfte man im Sommer wohl nur schwerlich dünne Schnitte fertig bringen. Zudem ist der hohe Preis des Oeles (das Kilo M. 12 gegen nur M. 1.40 für Benzol) doch auch zu berücksichtigen, namentlich in Laboratorien, wo viele Anfänger arbeiten. — Ueber Apáthys Methode siehe § 132. [M.]

die Objekte einfach in Paraffin gebracht, das gerade am Schmelzen erhalten wird, und darin bleiben sie so lange, bis sie ordentlich durchtränkt sind. Dabei wird aber das Paraffin ein oder zwei Mal gewechselt, wenn die Objekte so voluminös sind, dass sie eine beträchtliche Menge von dem Vorharz mit sich geführt haben. Mir erscheint die Methode, erst weiches Paraffin und dann hartes Paraffin zu nehmen, ganz trügerisch.

Dagegen ist es wichtig, das Paraffin trocken zu halten, d. h. es, während es flüssig ist, vor Wasserdämpfen zu schützen. Noch wichtiger aber ist es, es so nahe wie möglich am Schmelzpunkt zu halten. Wird es nämlich eine Zeit lang beträchtlich höher erhitzt, so steigt sein Schmelzpunkt, und man bekommt also, ohne es zu wollen, ein härteres Paraffin. Und für die gute Erhaltung der Gewebe ist es natürlich vortheilhaft, sie so wenig wie möglich zu erhitzen.

Die Dauer des Bades richtet sich selbstverständlich nach Art und Grösse des Objektes. Ein Embryo von 2—3 mm im Durchmesser kann in einer Stunde gut durchtränkt sein, oft auch schon eher, wenn er vorher in Cedernöl gewesen ist. Jedenfalls muss man die Objekte, sobald sie durchtränkt sind, rasch abkühlen (§ 135). Lässt man sie nämlich mehrere Stunden im Bade, wie das Manche thun, so können zarte Gewebe stark leiden. Denn worauf es hier am meisten ankommt, ist: die Wirkung der Hitze möglichst gering zu gestalten. Daher sollte man denn auch nicht nur das weichste Paraffin nehmen, das gerade noch gute Schnitte giebt (§ 143), sondern auch das Bad so kurz wie möglich dauern lassen.

Verwendet man Chloroform oder ein anderes flüchtiges[1]) Agens, so bieten sich zwei Wege dar: entweder erwärmt man nach Giesbrecht das Chloroform mit dem Objekte bis zum Schmelzpunkt des Paraffins,

---

[1]) Seit vielen Jahren verfahre ich selber wie folgt. Die Objekte bringe ich aus dem absol. Alkohol je nach ihrer Konsistenz rascher oder langsamer in Benzol, wechsele dieses 1 oder 2 Mal, um sicher allen Alkohol entfernt zu haben, gebe dann einige Stückchen des definitiven Paraffins (meist von 58 60° Schmelzpunkt) hinzu und lasse es sich bei gewöhnlicher Temperatur lösen. Nach mehreren (bis zu 18) Stunden bringe ich Objekte und Flüssigkeit in einem offenen Gefässe in das kalte Wasserbad, erwärme dieses ganz allmählich (in etwa 2 Stunden) auf 60° C., giesse in dem Maasse, wie das Benzol verdampft, geschmolzenes Paraffin nach und wechsele zum Schluss das Paraffin nochmals ganz, ehe ich zum Einbetten schreite. Ueber Nacht lasse ich nur ausnahmsweise ein Objekt im Wasserbade. [M.]

setzt dieses allmählich zu und hält die ganze Masse in derselben Wärme solange, bis alles Chloroform entwichen ist; oder man bringt nach Bütschli die Objekte einfach direkt vom Chloroform in ein Gemisch von diesem und Paraffin, lässt sie bis zur völligen Durchtränkung ($^1/_2$ Stunde) darin und treibt nun das Chloroform beim Schmelzpunkte des Paraffins aus. Bütschli empfiehlt ein Gemisch, das bei 35° C. schmilzt und aus etwa gleichen Theilen von Paraffin von 50° C. Schmelzpunkt und Chloroform besteht. Die grösseren Objekte aber, wo das völlige Abdunsten des Chloroforms sehr lange dauern könnte, bringt er direkt aus dem Gemisch in reines Paraffin.

Giesbrechts Methode (Z. Anzeiger 4. Jahrg. 1881 p. 484) ist mehr im Einzelnen wie folgt. Die Objekte kommen aus dem absoluten Alkohol in Chloroform, dem eventuell etwas Aether zugesetzt ist, um das Schwimmen der Objekte zu verhüten. Sobald sie sich damit gut durchtränkt haben, wird Alles zusammen bis zum Schmelzpunkte des Paraffins erwärmt, und zugleich werden allmählich kleine Stücke Paraffin hineingeworfen. Sobald man keine Gasblasen mehr aus den Objekten aufsteigen sieht, hört man mit dem Zusatz von Paraffin auf, denn das ist ein Zeichen davon, dass das Chloroform ganz durch Paraffin verdrängt ist. Da aber dies allmählich geschieht, so wird die Schrumpfung der Gewebe auf ein Minimum reduzirt.

Aehnlich wie Bütschli verfährt Heidenhain (Festschr. Kölliker Leipzig 1892 p. 114), nur nimmt er Bergamottöl, und zwar erst ein Gemisch von diesem und absolutem Alkokol zu gleichen Theilen, dann reines Oel, darauf Oel und Paraffin, dann Paraffin von 45°, endlich solches von 58° Schmelzpunkt; sind die Gewebe vorher sorgfältig behandelt worden, so leiden sie bei 60° C. gar nicht.

Rabl (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 164) bettet aus Chloroform oder Bergamottöl ein: er bringt das Objekt zunächst aus dem absol. Alkohol allmählich in eins von diesen Vorharzen, dann bei 50° C. in Paraffin von 45° Schmelzpunkt, bis jede Spur des Vorharzes entfernt ist, endlich auf kurze Zeit in solches von 56°, das aber vorher auf 80—90° erwärmt worden ist.

Apáthy (Mikrotechnik p. 149) bringt die Objekte aus dem absol. Alkohol nach der Methode von Mayer oder Giesbrecht (§ 111) in reines Cedernöl, benutzt dessen aufhellende Wirkung dazu, sie in toto zu studiren, zu messen und zu zeichnen, führt sie dann ebenso behutsam in eine kalt gesättigte Lösung von Paraffin (Schmelzpunkt 55° C.) in Chloroform über, erwärmt sie darin auf etwa 60°, legt sie auf mehrere Stunden in reines Paraffin von 55° C. und bettet sie zuletzt ein. (Ueber die Einzelheiten der Vertreibung des Chloroforms s. das Original.)

133. Oefen und Wasserbäder. Das Paraffin darf, während es flüssig ist, durchaus nicht mit Wasserdampf in Berührung kommen. Verwendet man daher ein Wasserbad beim Einbetten, so muss man hierauf Rücksicht nehmen.

In der Zeit. Wiss. Mikr. findet man eine ganze Anzahl Wasserbäder und Luftbäder für Heizung mit Gas, Alkohol, Petroleum etc. beschrieben. Von ihnen gilt wie auch sonst überall: je einfacher, desto besser! Auch hängt

ungemein viel von der Geschicklichkeit des Forschers ab: man glaubt z. B. neuerdings, ohne Thermostaten nicht auskommen zu können, und doch lässt sich mit einer einfachen Spirituslampe, deren Docht man möglichst niedrig schraubt und vor Zug schützt, die Temperatur des Paraffins konstant genug erhalten.

134. Einbetten bei vermindertem Luftdruck. Für Objekte, die sich wegen ihrer Grösse oder Konsistenz selbst in mehreren Tagen nicht auf die gewöhnliche Art mit Paraffin durchtränken lassen, ist das Einbetten bei vermindertem Druck äusserst wichtig. Es sichert nämlich nicht nur das vollständige Eindringen des Paraffins schon in wenigen Minuten, sondern verhindert auch das Zusammenfallen der Gewebe, wie es bei Objekten mit grossen Hohlräumen im Innern leicht vorkommt, wenn man sie nach der gewöhnlichen Weise einbettet. Dies lässt sich ganz einfach durch irgend eine Vorrichtung bewirken, die das Paraffin unter der Luftpumpe flüssig hält. So erzeugt Hoffmann (Z. Anzeiger 8. Jahrg. 1884 p. 230) das Vacuum durch eine Wasserluftpumpe, wobei das Gefäss mit dem Paraffin in einem Exsiccator steht, der in einem Wasserbade warm erhalten wird und mit der Pumpe durch ein Rohr verbunden ist. Das geht bequem und sicher, falls man nur den nöthigen Druck in der Wasserleitung hat. Ferner hat Francotte (Bull. Soc. Belg. Micr. 1884 p. 45) einen Apparat angegeben, wobei das Vacuum durch Kondensation von Wasserdampf hervorgebracht wird. — Fol (Lehrbuch p. 121) verwendet den Apparat von Hoffmann in etwas einfacherer Form: das Paraffin ist in einem weiten Reagensglase enthalten, durch dessen Kautschukpfropfen ein Rohr zur Verbindung mit der Pumpe geht; das Reagensglas taucht in ein Wasserbad ein. Man pumpt die Luft 1 oder 2 Mal aus, wartet einige Minuten, um sicher zu wissen, dass keine Luftblasen mehr aufsteigen, lässt dann die Luft ein, giesst das Paraffin aus (Fol giebt an, es sei inzwischen schwer schmelzbar geworden) und bettet das Objekt in frisches Paraffin um.

135. Einbetten und Abkühlen. Sobald die Objekte gut mit Paraffin durchtränkt sind, müssen sie nach einer der oben angegebenen Methoden (§ 129) eingebettet werden. Hat man sich dabei des Uhrglases bedient, so ist natürlich kein weiteres Einbetten mehr nöthig. Stets aber ist es wichtig, das Paraffin so rasch wie möglich abzukühlen, damit es nicht auskristallisiren kann (dies kommt bei langsamem Erkalten leicht vor), sondern eine möglichst homogene Masse bildet.

Sehr kleine Objekte nimmt man aus dem Paraffin mit einer Nadel oder einem kleinen Spatel heraus, legt sie zum Abkühlen auf Glas und bettet sie dann mit einer heissen Nadel (§ 129) auf einem Block von Paraffin definitiv zum Schneiden ein. Dabei möge man aber mit der Nadel nur ja recht wenig Paraffin auf ein Mal schmelzen, damit es ganz rasch wieder hart werden kann.

Ueber die Methoden von Boveri und Lauterborn zum Einbetten kleiner Objekte s. § 578 und 877.

Hat man mit dem Uhrglas gearbeitet, so lässt man dieses mit den Objekten darin auf kaltem Wasser schwimmen; aber es darf erst dann untergetaucht werden, wenn das Paraffin hart geworden ist. Später schneidet man die Blöcke mit den Objekten heraus, und zwar mit einem nur leicht erwärmten Messer. — Die Papierkästchen lässt man ebenfalls auf Wasser schwimmen und gleichfalls erst dann untertauchen, wenn das Paraffin auch oben hart geworden ist, sonst bekommt man leicht Höhlungen voll Wasser im Paraffin. Dasselbe gilt von den Formen aus Messing.

Selenka lässt durch sein Glasrohr (oben p. 74) kaltes Wasser fliessen; ähnlich verfährt Andrews. Ein kleines transportables Wasserbad hierfür hat Mayer angegeben (Mitth. Z. Stat. Neapel 4. Bd. 1883 p. 429; Internation. Monatschr. Anat. Hist. 4. Bd. 1887 p. 39); er benutzt es in Verbindung mit seinen paraffindichten Formen (oben p. 74) und kann damit auch unter dem Präparirmikroskope bei auf- oder durchfallendem Lichte einbetten, was für kleine Objekte vortheilhaft werden mag. Haben diese ihre definitive Lage erhalten, so lässt man durch das Wasserbad kaltes Wasser strömen, sodass das Paraffin ohne irgend welche Erschütterung rasch erstarrt.

Sind die Objekte endlich auf dem Mikrotom in der zum Schneiden erforderlichen Richtung (s. die beiden Figuren auf p. 85) aufgekittet oder eingespannt, so sehe man sich den Paraffinblock mit einer Lupe genau an. Zeigt er Blasen, Höhlen oder weisse Stellen, so steche man mit einer heissen Nadel hinein, bis Alles wieder glatt und homogen ist. Die paar Minuten hierfür sind gut angewandt.

Einige Forscher geben an, man solle zarte Objekte recht bald nach dem Einbetten schneiden, da das Paraffin selbst nach raschem Erkalten doch noch langsam Kristalle bilden könne. Aber diese Gefahr wird durch wirklich gutes Abkühlen sehr vermindert. Und nach meinen Erfahrungen ist der Schaden, der aus der Kristallisation entstehen kann, stark übertrieben worden. Wie schon in der Einleitung (p. 5) erwähnt, kenne ich kein besseres Mittel zur Aufbewahrung der Gewebe als das Paraffin.

136. Orientiren. Die oben beschriebenen Manipulationen genügen in den meisten Fällen zur definitiven Einbettung. Indessen ist es mitunter erwünscht, dem Objekt im Paraffinblock eine ganz bestimmte Lage geben und es auch von aussen in dieser bequem erkennen zu können. Hier ist nun besonders die Methode von Patten (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 13) nützlich, da sie viele kleine, einander ähnliche Objekte genau zu orientiren gestattet. Man nimmt dazu Schreibpapier mit zwei Systemen erhabener paralleler Linien

(Rippen), die sich unter rechten Winkeln kreuzen; hiervon schneidet man schmale Streifen und setzt darauf längs einer dieser Rippen in angemessenen Abständen Tröpfchen eines honigdicken Gemisches von Kollodium und Nelkenöl. Die Objekte sind vorher schon mit Nelken- oder Bergamottöl (nicht Terpentinöl) durchtränkt worden, werden dann eins nach dem anderen auf einem spitzen Messer herausgeholt und nach dem Absaugen des überschüssigen Oels mit Filtrirpapier jedes in einen von den Tropfen befördert. Hierin können sie unter dem Präparirmikroskop orientirt werden und behalten dann ihre Lage bei. Hat man nun 1/2 Dutzend oder mehr so orientirt, dass die spätere Schnittebene den Querrippen parallel läuft, so versenkt man das Papier in Terpentinöl, das das Nelkenöl (Bergamottöl) verdrängt und die Objekte auf dem Papier ordentlich festklebt. Darauf wandert das Papier in das Paraffinbad und wird zuletzt wie gewöhnlich eingebettet. Nach dem Abkühlen unter Wasser wird der Block zurechtgeschnitten und das Papier abgezogen; es bleiben aber nun zur Orientirung die Abdrücke der Rippen auf dem Paraffin zurück, desgleichen irgend welche Zahlen etc., die man vor dem Einbetten mit weichem Bleistift auf das Papier geschrieben hatte.

Eine etwas komplizirtere Art beschreibt Woodworth (Bull. Mus. Harvard Coll. Vol. 25 1893 p. 45). Aehnlich verfahren übrigens Field & Martin (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 11), nehmen aber statt des Papiers schmale Streifen von Gelatine. — Die Methode von Schydlowski (ibid. 13. Bd. 1896 p. 200) ist keiner allgemeinen Verwendung fähig. — Dagegen hat Samter (ibid. 13. Bd. 1897 p. 441) eine allerdings auch nicht gerade einfache Art für kleine kugelige Objekte angegeben, die aber praktisch zu sein scheint. Er spannt ein Stück Eihaut von einem Hühnerei trocken auf einen kleinen Metallrahmen, der hierfür oben einige Stecknadelspitzen trägt, sticht mit einer Nadel in geeigneten Abständen feine Löcher in die Haut, giebt von unten her in jedes Loch eine Spur von ziemlich zähem Fischleim, bringt den Rahmen in Alkohol von 50% und setzt auf jedes Loch eins von den Objekten; diese kleben sofort an und können auf dem Rahmen in Alkohol von 60%, dann von 90% übertragen werden; hier wird die Haut vom Rahmen abgenommen und nach Bedarf in rechtwinklige Streifen zerschnitten, deren Ränder später im Paraffin zum Orientiren dienen.

137. Schneiden und Strecken der Schnitte. Paraffin wird mit einem trockenen Messer geschnitten, d. h. das Messer wird nicht mit Alkohol, Wasser etc. befeuchtet. So werden die Schnitte zwar besser, rollen sich aber gern auf der Schneide zusammen, und oft so stark, dass sie sich gar nicht wieder strecken lassen. Zur Vermeidung des Rollens ist auf folgende Punkte zu achten.

Vor allem darf das Paraffin nicht zu hart sein, sondern sein Schmelzpunkt muss der Temperatur im Laboratorium entsprechen (im Winter bei 15—17° C. nehme man es von 45°, im Hochsommer bei 22° C. von 48°; siehe indessen § 143). Der genaue Grad der Härte muss experimentell festgestellt werden. Zeigt es sich beim Schneiden,

dass das Paraffin zu hart ist, so lässt es sich nach Fol (Lehrbuch p. 123) weicher machen: eine Lampe mit einem parabolischen Reflektor wird neben dem Mikrotom so aufgestellt, dass die Wärmestrahlen auf das Objekt fallen; die richtige Temperatur erhält man durch Verschieben der Lampe. Dies ist gar kein theoretisches Hirngespinnst, sondern eine sehr praktische Einrichtung. Ein Reflektor erscheint mir freilich nicht nöthig, und eine Spirituslampe bringt auch schon mitunter in wenigen Minuten das Paraffin zur richtigen Konsistenz. Ist es dagegen zu weich, so kann man es härter machen, wenn man in das Centrum des Reflektors ein Stück Eis legt. Uebrigens genügt oft schon zur Erzielung der richtigen Härte das Oeffnen oder Schliessen der Fenster, das Anschüren des Feuers im Ofen, das Vorsetzen eines Ofenschirms u. s. w.

Zweitens sollte man das Messer quer richten, denn die schräge Stellung bringt das Rollen hervor, und je schräger es steht, desto mehr rollen sich die Schnitte zusammen. Drittens schneidet man besser Bänder (§ 138) als einzelne Schnitte: oft werden die Bänder ganz flach, während die einzelnen Schnitte sich sofort rollen.

Man hat auch besondere Einbettmassen gegen das Rollen empfohlen, so z. B. ein Gemisch von 4 Theilen Paraffin und 1 Theil Vaselin, indessen bin ich der Ansicht, man solle sie vermeiden. Dagegen kann man mechanische Mittel anwenden; von diesen ist das einfachste und wohl das beste folgendes: beim Schneiden hält man die Ecke, die zu rollen anfängt, mit der flachen Spitze eines feinen Pinsels oder mit einem kleinen Papierstreifen, der an einem Skalpell steckt, auf dem Messer nieder. Man bedient sich zum gleichen Zwecke auch der sogenannten Schnittstrecker; diese bestehen im Wesentlichen aus einem kleinen Metallcylinder, unter dem der Schnitt mit ganz leichter Reibung hindurch muss und so am Rollen verhindert wird. Von den zahlreichen Arten dieses kleinen Instrumentes scheint mir noch am besten der von Born (Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 157) zu sein[1]; alle aber sind nicht leicht zu gebrauchen, und wenn man sie nicht genau eingestellt hat, so können sie die Schnitte leicht beschädigen.

Literatur über Schnittstrecker: F. E. Schulze (Z. Anzeiger 6 Jahrg. 1883 p. 100); Andres, Giesbrecht & Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 4. Bd. 1883 p. 429); Decker (Arch. Mikr. Anat. 23. Bd. 1884 p. 537; ähnlich dem von Mayer).

---

[1]) Diesem Urtheil kann ich mich nicht anschliessen, sondern halte nach wie vor den von mir angegebenen nicht nur für den theoretisch richtigsten, sondern auch für den tauglichsten. [M.]

Francotte (Bull. Soc. Belg. Micr. Tome 10 1883 p. 55; Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 572); Strasser (ibid. 4. Bd. 1887 p. 218; 7. Bd. 1890 p. 291; nur für ganz grosse Schnitte); Klercker (Verh. Biol. Ver. Stockholm 4. Bd. 1892 p. 16; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 254; gar zu primitiv); Kornauth (ibid. 13. Bd. 1896 p. 160: ähnlich dem von Mayer).

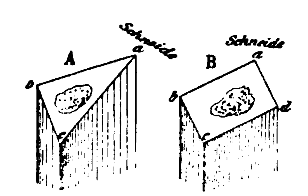
Ein anderer Plan besteht darin, die Schnitte sich rollen zu lassen, aber das Rollen zu kontroliren. Zu diesem Zwecke wird der Paraffinblock zu einem Keil zugeschnitten, der etwa 5—6 mal so lang wie breit ist; das Objekt liegt dicht an der Basis des Keils, und die Spitze sieht gegen das Messer. Nun dürfen sich die Schnitte ruhig rollen, denn das Objekt liegt ja am Ende der Rolle, und das wird beinahe flach. Legt man also den Schnitt mit dem breiten Ende auf den Objektträger, so rollt er sich bei gelindem Erwärmen des Glases völlig auf und liegt flach da.

Die genaue Prüfung der Schnitte zeigt zuweilen Zerrungen und Verlagerungen oder sogar Brüche in den zarteren Theilen der Gewebe. Oft habe ich gefunden, dass in manchen Partien meiner Schnitte alle karyokinetischen Figuren nach der einen Seite, und zwar immer der nämlichen, des Kerns lagen, während der Rest des Kerns leer und anscheinend vacuolär war. Die achromatischen Spindelfasern waren oft zerrissen, und nicht selten lagen einzelne Chromosomen weit vom Kern im Plasma oder sogar ausserhalb der Zelle. Diese Erscheinungen sind allgemein der Schrumpfung beim Fixiren, Entwässern oder Einbetten zugeschrieben worden; M. Heidenhain (Festschr. Kölliker Leipzig 1892 p. 114) meint, sie würden oft durch die zu grosse Neigung der Unterfläche des Messers verursacht, und dann sollte man dem Messer durch Einlegen eines Stückes Pappe oder eines Keiles von Metall in den Messerhalter die richtige Neigung geben. Ich meine aber, eine andere Ursache dieser Fehler liegt in der schlechten Beschaffenheit der Schneide: ist das Messer stumpf oder hat es eine runde oder gebogene Schneide (in Folge von schlechtem Abziehen), so wird es auf die feinen Elemente eher wie ein Pflug als wie ein Schneidwerkzeug wirken und so die geschilderten Erscheinungen hervorrufen.

Apparate zum Erwärmen oder Abkühlen des Messers, um bessere Schnitte zu erhalten, sind mehrere beschrieben worden; s. van Walsem in: Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 218. Ich selber habe es auch zuweilen gut gefunden, das Messer zu erwärmen.

Je nachdem man mit längs- oder mit quergestelltem Messer schneiden will, muss man dem Paraffinblock eine andere Form geben. Im ersten Falle (Fig. A) schneidet man ihn (aus freier Hand) zu einem dreiseitigen Prisma zu und orientirt dieses so, dass das Messer am Eck *a* einschneidet und am Eck *c* austritt; alsdann wird der Schnitt auf der Schneide nur mit dem Punkt *c* haften, kann also leicht mit einer Pinzette oder Nadel abgenommen werden. Das Objekt

liege nahe der Linie *b c*, damit man zunächst nur Paraffin schneide und, falls es zu rollen Miene macht, es entweder mit dem Schnittstrecker oder dem Pinsel etc. flach drücken könne, bevor das Objekt selber geschnitten wird. Im zweiten Falle (B) schneidet man vortheilhafter den Block zu einem rechtwinkligen Prisma zu und orientiert ihn ähnlich wie beim schrägen Messer, also derart, dass die Schneide bei *a* ein-, bei *c* austritt; will man jedoch Bänder schneiden (§ 138), so müssen *a b* und *c d* unter sich genau parallel sein und auch parallel zur Schneide gerichtet werden.



Es ist durchaus nicht immer einerlei, von welcher Seite man das Objekt anschneidet: ist es einigermaassen gross, nicht isodiametrisch und gar von ungleichmässiger Textur, so kann es leicht sein, dass man schlechte Schnitte bekommt, die sich zusammendrücken oder zerreissen, während man gleich darauf, wenn man es anders zum Messer gestellt hat, tadellose Schnitte erhält. Leider lassen sich hierüber keine allgemein gültigen Regeln geben, ausser der, dass man, wenn es in einer Richtung nicht geht, es mit einer anderen oder einer dritten versuchen möge. So viel scheint jedoch festzustehen, dass schwierige Objekte sich mit längsgestelltem Messer eher gut schneiden lassen als mit querem, und mit einem langsam arbeitenden besser als mit einem Schaukelmikrotom oder ähnlichen Instrumenten, wo das Messer mit grosser Geschwindigkeit quer durch das Paraffin fährt.

Von neueren Autoren sprechen sich entschieden zu Gunsten des längsgestellten Messers aus Rawitz (Anat. Anzeiger 13. Bd. 1897 p. 65) und Apáthy (Mikrotechnik p. 183); R. unbedingt und A. wenigstens dann, wenn es sich um die Rekonstruktion („Synthese") handelt, wobei ja die Schnitte nicht merklich ver- oder zusammengeschoben sein dürfen. Dagegen schneidet Rabl Embryonen stets mit querem Messer, und Heidenhain betrachtet diese Stellung sogar als selbstverständlich.

138. Bandschneiden. Wenn man mehrere Schnitte hintereinander schneidet und sie ruhig auf dem Messer liegen lässt, statt jeden einzeln wegzunehmen, so haften sie nicht selten mit den Rändern aneinander und bilden so ein Band, das man auf den Objektträger legen kann, ohne dass es zerreisst. Dies erleichtert natürlich das Schneiden einer Serie sehr. Zur Erzielung eines solchen Bandes [1]) scheinen mir folgende Faktoren nothwendig zu sein.

---

[1]) Objekte von ungleicher Textur oder erheblicher Grösse schneiden sich auf diese Weise viel schlechter als mit längsgestelltem Messer; besonders gilt

Erstens muss der Schmelzpunkt des Paraffins in gewisser Beziehung zur Temperatur des Laboratoriums stehen. Kleine Schnitte bilden stets Bänder, wenn das Paraffin gut ist und bei 45 ° C. schmilzt, während die Aussenwärme 16—17 ° C. beträgt. (Die hier angegebenen Temperaturen beziehen sich auf ein Zimmer, das durch ein offenes Feuer geheizt wird, und passen wahrscheinlich nicht auf eins, das wie in Deutschland einen Ofen als Wärmequelle hat; s. auch § 143). Bei 15 ° ist das Paraffin ein wenig zu hart. Bei 22 ° C. wird der Schmelzpunkt wohl 48 ° betragen müssen, aber meine Erfahrungen reichen hier nicht aus. Zweitens muss das Messer quer stehen. Drittens muss der Block in einer ganz bestimmten Weise zugeschnitten sein und zur Messerschneide parallel stehen (s. Figur B. p. 85). Viertens muss man so rasch schneiden wie nur möglich; denn der Druck des Messers erzeugt dann etwas Wärme, und so werden die Ränder des Paraffins etwas weich, sodass die Schnitte aneinanderkleben. Es ist aber durchaus nicht nöthig, zur Erzeugung von Bändern

---

dies für Gewebe mit Chitin oder viel Muskulatur. Bänder zu schneiden empfiehlt sich also nur dann, wenn lange aber schmale Thiere, z. B. Würmer oder Embryonen etc. in Querschnitte zerlegt werden sollen, oder wenn man sich rasch über den Bau eines Organs oder Thieres orientiren will, endlich für Kurse, wo viele Schnitte zur Vertheilung an die Praktikanten in kurzer Zeit angefertigt werden müssen. So absolut sicher wie man mit dem längsgestellten Messer in ruhigem Tempo einen Schnitt nach dem anderen erhalten kann, arbeitet man nach der Bandmethode wohl nie.

Schon von Caldwell, dem Erfinder dieser Methode, ist angegeben worden, man müsse den Block nachträglich mit ganz weichem Paraffin umkleiden, damit die Schnitte besser aneinander haften. Im Texte ist hierauf nicht näher eingegangen worden, denn bei so weichem Paraffin, wie es dort vorgeschrieben ist, wird es kaum nöthig sein. Bettet man jedoch die Objekte in Paraffin von 55—60° Schmelzpunkt ein, so ist es für Schnitte von 10 μ absolut nöthig und für dünnere wenigstens rathsam, einen Mantel von weichem Paraffin (etwa 40° Schm.) um den Block zu legen. Dies macht man am besten so: ist der Block zugeschnitten, wie in Fig. B auf p. 85, so taucht man ihn in das weiche Paraffin, das man in einem Wasserbade auf etwa 80° erhitzt hat, auf einen Augenblick ein, dreht ihn sofort um, damit das flüssige Paraffin sich möglichst an die Basis des Blockes ziehe, lässt ihn wieder erkalten und schneidet nun an den Kanten *b c* und *a d*, nicht aber auch an *a b* und *c d*, das weiche Paraffin weg. Bei grossen Objekten mag man den Mantel durch zweimaliges Eintauchen stärker machen. Jedenfalls muss man den Block aber in das Mikrotom genau so wie vorher einsetzen, d. h. mit den Kanten *a b* und *c d* parallel zur Messerschneide; am Jungschen Schaukelmikrotom wird dies durch eine eigene Vorrichtung auf sehr bequeme und einfache Art erreicht. [M.]

sich besonderer Mikrotome zu bedienen, sondern das Jungsche Schlittenmikrotom thut es auch, wenn nur die Messerbahn gut geölt ist. Allerdings sind die automatischen Mikrotome sicherlich hierfür am besten, und unter diesen wieder das Schaukelmikrotom, das von Reinhold-Giltay und das von Minot (§ 127).

Um die Schnitte besser aneinander haften zu lassen, ist Verschiedenes empfohlen worden, z. B. Ueberziehen der Ränder des Blockes mit weichem Paraffin oder Kanadabalsam, oder die Verwendung von besonders zubereitetem Paraffin etc. (s. unten § 143), aber das ist Alles unnöthig (s. jedoch die Anmerkung auf p. 86).

Es passirt wohl, allerdings selten, dass das Schnittband beim Schneiden elektrisch wird und nun in der Luft seltsame Kurven beschreibt, sich auch in unerwünschter Art an feste Gegenstände anschmiegt. Durch leichtes Erwärmen wird es wieder flach, aber bisher kennt man kein Mittel, um das Auftreten dieser elektrischen Spannung zu verhüten.

139. Bestreichen des Blockes mit Kollodium. Manche Objekte sind so brüchig, dass sie trotz aller Vorsicht beim Einbetten und der vorherigen Behandlung beim Schneiden krümeln oder so zerbrechliche Schnitte liefern, dass man sie nicht unverletzt würde auf den Objektträger bringen können. Dies gilt oft von Eiern. Man hilft dem einfach dadurch ab, dass man die obere Fläche des Blockes vor jedem Schnitte ganz dünn mit Kollodium überstreicht, das die Theile auch der zerbrechlichsten Schnitte merkwürdig gut zusammenhält; und wenn man bei nicht besonders zerbrechlichen Objekten ebenso verfährt, so kann man viel dünner schneiden als sonst: Bütschli hat auf diese Weise Schnitte von weniger als 1 μ Dicke erzielt.

Mark (Amer. Natural. Vol. 19 1885 p. 628; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1885 p. 738) empfiehlt ein so schwaches Kollodium, dass es in dünner Schicht auf dem Blocke in 2—3 Sekunden fest wird, ohne zu glänzen. (Sobald es zu dick wird, muss man es wieder mit Aether verdünnen.) Man taucht nun einen feinen Pinsel nur mit der Spitze hinein, streicht ihn am Halse der Flasche ab, so dass er gerade noch feucht ist, und fährt damit über den Block hin, darf aber ja nicht auch an den Seiten hinab fahren, denn sonst haftet der Schnitt nachher am Messer. Sobald das Kollodium trocken ist, also nach 2—3 Sekunden, schneidet man, zieht das Messer zurück und bestreicht sofort wieder den Block, sodass dieser trocknet, während man den vorigen Schnitt vom Messer nimmt. — Henking (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 478) ist hiermit nicht zufrieden, weil der Aether das Paraffin erweiche, sondern räth zum Bestreichen eine Lösung von Paraffin in absol. Alkohol

an, ferner für äusserst zerbrechliche Objekte (Eier von Phalangiden) eine schwache (hellgelbe) Lösung von Schellack in absolutem Alkohol. Heider (Embryonalentwickelung von *Hydrophilus* 1889 p. 12; Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1892 p. 509) löst Mastix in Aether zu einem Syrup, mischt diesen mit dem gleichen Volumen Kollodium und verdünnt stark mit Aether. Rabl (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 170) streicht Paraffin, das bei etwa 52° C. schmilzt, aber auf einem Wasserbade weit höher erwärmt worden ist, mit einem Pinsel rasch über die Schnittfläche des Blockes hin und erhält dann zusammenhängende Schnitte, die sich gar nicht oder kaum rollen. Apáthy (Mikrotechnik p. 123) bedient sich einer 1 %igen Lösung von Celloidin.

140. Glätten der Schnitte. Die Schnitte werden auf dem Objektträger meist in bestimmter Ordnung niedergelegt (s. hierüber Capitel 9). Haben sie sich aber beim Schneiden gefaltet oder zusammengeschoben, so müssen sie vorher wieder geglättet werden.

Um Schnitte zu glätten, lässt man wohl am besten warmes Wasser oder warmen Alkohol auf sie einwirken (Gaskell in: Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 31 1890 p. 382; Duval in: Journ. Anat. Phys. Paris 27. Année 1891 p. 26; Henneguy ibid. p. 398; Gulland in: Journ. Anat. Phys. London Vol. 26 1891 p. 56 etc.): man bringt die Schnitte auf die warme Flüssigkeit (in einem Uhrglase oder sonst einem tauglichen Gefäss), lässt sie schwimmen, wobei sie glatt werden, und überträgt sie dann auf den Objekträger. Oder ist das Wasser auf diesem, so werden die Schnitte darauf gelegt, und nun wird der Objektträger auf etwa 45—50° C. erwärmt, bis die Schnitte sich strecken, was in wenigen Sekunden geschieht. Letztere Methode kann gleichzeitig zum Aufkleben der Schnitte dienen (s. hierüber § 184 und 189).

van Walsem (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 228) ordnet die Schnitte auf einem Streifen Pergamentpapier an, das dann befeuchtet und über eine geheizte Walze geführt wird, die sich in einem Gefässe mit Wasser dreht.

141. Einschliessen in Balsam. Sind die Schnitte geglättet und (falls man sie nicht etwa lose behalten will) auch gut auf dem Objektträger befestigt (§ 183 ff.), so braucht man nur noch das Paraffin zu entfernen und kann sie dann entweder direkt oder erst nach der Färbung einschliessen. Als Lösemittel des Paraffins sind empfohlen worden: Terpentinöl kalt oder warm, ein Gemisch von 4 Theilen Terpentinöl mit 1 Theil Kreosot, Kreosot allein, Terpentinöl mit Nelkenöl, ferner Benzol, Toluol, Xylol, eine schwache Lösung von Kanadabalsam in

Xylol (nur für sehr dünne Schnitte), heisser absoluter Alkohol, Erdöl (Naphtha) oder ein anderes Steinöl von niedrigem Schmelzpunkt. Brauchbar sind diese alle, aber am besten sind doch wohl Xylol und Toluol.

Hat man die Schnitte auf dem Objektträger bis zum Schmelzen des Paraffins erwärmt, so löst sich dieses, wenn man den Objektträger in ein Glas mit Xylol oder Toluol bringt, in wenigen Sekunden (dicke Schnitte brauchen erheblich mehr Zeit).

Will man sie dann einschliessen, so kann dies sofort geschehen, will man sie färben, so wandert der Objektträger zunächst in ein Glas voll Alkohol, um das Xylol etc. zu entfernen, und von da entweder direkt in das Färbbad, falls es stark alkoholisch ist, oder erst in schwächeren Alkohol und eventuell von da noch in Wasser, falls es wässerig ist.

142. Rekapitulation der Paraffinmethode, wie ich sie anempfehle. Man gebe in einen kleinen Glastubus soviel Cedernöl, dass das Objekt ganz davon bedeckt werden kann, schichte sorgfältig ebenso viel absoluten Alkohol darüber, bringe das gut entwässerte Objekt sacht in den Alkohol und lasse es darin, bis es ganz im Oel versunken ist und die Schlieren (§ 111) verschwunden sind. Nun übertrage man das Objekt auf das Wasserbad in ein Uhrglas voll geschmolzenes Paraffin; dieses muss aber von dem niedrigsten Schmelzpunkt sein, der gerade noch dünne Schnitte erlaubt, und daher muss Alles in einem kühlen Zimmer geschehen, damit man, wenn irgend möglich, diesen nicht über 45 ° C. zu nehmen braucht (s. aber § 143). Nach einer Weile bringe man das Objekt in ein anderes Uhrglas voll Paraffin und, wenn es gross ist, thue man dies nochmals. Sobald es ordentlich damit durchtränkt ist, lasse man das Uhrglas auf kaltem Wasser schwimmen, und wenn es kalt ist, so schneide man den Block mit dem Objekt heraus und schmelze ihn mit einer heissen Nadel auf dem Objekthalter des Mikrotoms fest. Dann schneide man den Block rechtwinklig und auch möglichst nahe am Objekte zu, lasse jedoch an der Seite nach dem Messer zu 1—2 Millimeter (je nach der Grösse des Objektes) mehr Paraffin übrig. Das Messer stelle man (falls das Objekt dies erlaubt, s. p. 85) quer und richte auch den Block quer zum Messer. Nun schneide man Bänder (bestreiche eventuell die Schnitte mit Kollodium), klebe sie in Serien (s. Kapitel 9) auf dem

Objektträger fest, erwärme diesen und löse das Paraffin mit Xylol auf. Endlich färbe man die Schnitte oder schliesse sie direkt in Harz ein.

Eine recht komplizirte Methode zur Behandlung von Paraffinschnitten, die nicht aufgeklebt werden sollen, beschreibt van Walsem (Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1897 p. 428.)

Paraffin-Massen.

143. Reines Paraffin. Gegenwärtig wird ziemlich allgemein angenommen, dass reines Paraffin für die gewöhnlichen Arbeiten eine Einbettmasse liefert, die den zahlreichen früher empfohlenen Gemischen von Wachs mit Oel u. s. w. weit überlegen ist; auf diese soll daher gar nicht weiter eingegangen werden. Hier brauche ich nur zu wiederholen, dass nach meiner Erfahrung ein Paraffin von 45° C. Schmelzpunkt die besten Resultate giebt, so lange die Temperatur im Laboratorium zwischen 15 und 17° C. bleibt, während für 22° C. eins von 48° C. erforderlich ist. Steigt aber die Temperatur im Laboratorium weit über 22°, so mag man nur ruhig das Schneiden lassen, denn gute Schnitte erhält man dann doch nicht. Uebrigens kann man mit einer harten Klinge härteres Paraffin schneiden als mit einer weichen.

Paraffine von den genannten Schmelzpunkten sind im Handel leicht zu haben, und die Sorten dazwischen lassen sich durch Zusammenschmelzen herstellen. Zwei Theile Paraffin von 50° C. und 1 Theil von 36° geben eine Masse von 48°.

Manche Forscher von unzweifelhafter Kompetenz ziehen Massen von etwas höheren Schmelzpunkten, nämlich von 50—55° C. für die normale Temperatur des Laboratoriums vor. Einige gehen sogar bis 60° C. oder höher.[1]) Indessen ich bin nach wie vor davon überzeugt,

---

[1]) Dies thun z. B. Heidenhain (58°), Apáthy (55°), Rabl (56°), ich selber (58—60°); s. hierüber § 132 (p. 78 u. 79); und sie alle nehmen wohl, auch ohne dies ausdrücklich zu sagen, ein um so härteres Paraffin, je dünner die Schnitte werden sollen. In Neapel, überhaupt in wärmeren Klimaten, wäre das Verfahren, wie es Lee im Texte angiebt, einfach unthunlich, denn eine Temperatur über 22° hat man in den Zimmern dort im Sommer und Herbst etwa 5 Monate lang, will oder muss aber doch selbst bei 30° schneiden. Natürlich wird man da, wo man mit einem weicheren Paraffin auskommen kann, nicht unnöthig härteres nehmen, wie ich denn auch selber im Winter eins von etwa 56° oder noch weniger verwende. Aber unter 50° würde ich nie gehen. Strasser (Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 7) braucht Paraffin von höchstens 40°, aber nur für seine Riesenschnitte von 10×15 cm Fläche. Michel (C. R. Soc. Biol. Paris (10) Tome 4 1897 p. 549) durchtränkt die Gewebe mit Paraffin von 45° Schmelzpunkt und bettet sie in solches von 55° ein. [M.]

dass solche Paraffine nicht nur für die Gewebe äusserst gefährlich sind, sondern auch in gemässigtem Klima gar keine Berechtigung haben.

Die obigen Zahlen sind öfter verifizirt worden und ohne Zweifel korrekt. Aber sie bedürfen noch einer wichtigen Erläuterung: sie beziehen sich auf das Schneiden mit dem Jungschen Schlittenmikrotom. Ich habe nämlich später ermittelt, dass die Mikrotome mit festem Messer, wie das Schaukelmikrotom, das von Minot oder Reinhold-Giltay, gute Resultate nur mit viel härterem Paraffin geben, so weit es auf das Schneiden selber ankommt. Das ist natürlich insofern ein Vortheil, als man sehr dünne Schnitte produziren kann, aber es bleibt darum doch für feinere Arbeiten wahr, dass man im Interesse der guten Erhaltung der Gewebe ein möglichst leicht schmelzbares Paraffin nehmen sollte.

144. Ueberhitztes Paraffin. Graf Spee (Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 8) empfiehlt als besonders günstig für Schnittbänder folgende Art Paraffin. Man erhitzt Paraffin, das bei etwa 50° C. schmilzt, in einer Porzellanschale auf einer kleinen Flamme. Nach einer Weile stösst es übelriechende weisse Dämpfe aus und nimmt ein wenig an Volum ab; dies ist je nach der Qualität des Paraffins in 1—6 Stunden der Fall. Die Masse wird dann bräunlichgelb und sieht nach dem Erkalten auf dem Schnitt fettig oder seifig aus. Zugleich ist der Schmelzpunkt um einige Grade gestiegen. Die Masse ist übrigens bei Grübler & Hollborn käuflich zu haben.

Brass (Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 300) empfiehlt Paraffin, das schon mehrere Jahre gelegen hat, da es weniger leicht kristallinisch werde als neues. Darin stimme ich ihm bei.

Seifen.

145. Nutzen der Seifen. Die Seifen haben ohne Zweifel manche guten Eigenschaften. Sie lösen sich in Alkohol, sind sehr durchsichtig, dringen gut ein und sollen sich, wenn sie gut sind, viel besser als selbst Paraffin schneiden. Man schneidet sie trocken oder unter Alkohol. Was die Erhaltung der Gewebe in ihnen angeht, so sind sie alkalisch, und das spricht gegen sie; indessen ziehen einige Forscher sie dem Paraffin immer noch vor, und sie sind denn auch von Chun für so zarte Objekte wie die Siphonophoren deswegen empfohlen worden, weil diese in ihnen weniger schrumpfen sollen als in

Paraffin. Sicher können Seifen dann von Nutzen sein, wenn die Objekte die völlige Entwässerung nicht vertragen, ohne zu schrumpfen. Man kann die Einbettung in Seife kurz als halbnass bezeichnen.

146. Transparentseife nach Pölzam. Salensky verfährt damit bei Salpen wie folgt (Morph. Jahrb. 3. Bd. 1887 p. 558). Gewöhnliche Kernseife wird in dünne Scheiben geschnitten und an der Sonne einige Tage liegen gelassen, bis sie trocken ist. Sie wird dann pulverisirt und mit Alkohol zu einem Brei angemacht. Dieser wird mit so viel Alkohol und Glycerin gemischt, dass auf je 10 Gewichtstheile Seife 22 Glycerin und 35 Alkohol (von 90 %) kommen. Das Gemisch wird gelinde gekocht, bis es ein ganz durchsichtiger gelblicher Syrup geworden ist. Die vorher entwässerten Objekte werden darin wie in Paraffin eingebettet. Aus den Schnitten wird die Seife mit Wasser oder sehr schwachem Alkohol entfernt.

147. Transparentseife nach Kadyi (Z. Anzeiger 2. Jahrg. 1879 p. 477). Von Stearin-Natronseife (die beste Sorte ist die weisse Wachskernseife des Handels) werden 25 g geschabt und in einer Retorte mit 100 ccm Alkohol von 96 % auf dem Wasserbade bis zur völligen Lösung erwärmt. Man filtrirt, falls es nöthig ist. Lässt man nun einen Tropfen hiervon in ein Uhrglas fallen, so erstarrt er fast sofort zu einer weissen Masse; dies ist ein Zeichen davon, dass die Masse noch zu wenig Wasser enthält. Nun setzt man aus einer Spritzflasche nach und nach etwas Wasser hinzu und probirt jedesmal einen Tropfen, bis dieser fast ganz durchsichtig mit einem leichten bläulichen Schimmer geworden ist. Zu der obigen Menge sind meist nur 5—10 g Wasser erforderlich, Genaueres lässt sich aber wegen der schwankenden Feuchtigkeit der Seife nicht angeben. Nimmt man zu viel Wasser, so erstarrt die Seife zu langsam oder gar nicht mehr, und die beste Konsistenz ist ihr gerade dann eigen, wenn sie das Minimum an Wasser enthält.

Ausser der oben angegebenen Masse lassen sich für besondere Zwecke auch gute Massen aus 10—40 % (auch mehr oder weniger) Seife in Alkohol gewinnen. So nimmt Weisker ungefähr gleiche Theile Seife und Alkohol; diese Masse ist zwar transparent, aber gelb und ölig und braucht lange Zeit zum Erstarren, ist dann auch sehr zäh, wird erst bei hoher Temperatur flüssig und dringt nicht so gut ein wie die Massen mit mehr Alkohol. Sie eignet sich aber sehr gut für harte, speziell für chitinöse Gewebe.

Die Kadyische Masse kocht bei 60—70 ° C. Zum Einbetten nimmt man ein Papierkästchen oder ein Uhrglas. Beim Schneiden

befeuchtet man Block und Messer mit starkem Alkohol; das Messer bleibt völlig rein, und das ist ein Vortheil dieser Methode. Die Schnitte kommen in Alkohol von 96 %, der die Seife sehr bald, in der Wärme augenblicklich, auszieht.

Ueber Einbettung in selbstbereitete Natronseife s. Döllken in: Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 33.

Gelatine-Massen.

148. Das Einbetten in Gelatine lässt sich mit Vortheil bei Geweben verwenden, die man gar nicht entwässern darf oder will, und mag deswegen gute Dienste bei sehr wasserhaltigen Objekten leisten. Im Ganzen verfährt man dabei wie bei den bisher erwähnten Massen, nur müssen hier die Objekte mit Wasser durchtränkt werden statt mit Alkohol oder einem Vorharze. Ist die Masse kalt geworden, so ist sie zuweilen direkt schneidbar, gewöhnlich muss sie aber erst noch gehärtet werden, und zwar entweder, indem man sie einige Minuten mit absolutem (Kaiser) oder einige Tage mit 90 %igem (Klebs) Alkohol oder mit Chromsäure (Klebs) oder mit Formol (Nicolas) behandelt oder endlich gefrieren lässt (Sollas). Aus den Schnitten schafft man sie mit heissem Wasser fort, wenn sie nicht etwa inzwischen unlöslich geworden ist.

Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. 1880 p. 27) härtet zu gröberen Untersuchungen nach dem Einbetten des Objekts die Gelatine in Alkohol von 80 %, benetzt auch beim Schneiden das Messer mit demselben Alkohol und belässt die Gelatine um die Schnitte, da sie in Balsam durchsichtig genug wird (vorausgesetzt, dass das Objekt in toto gefärbt worden ist). Als Unterlage, worauf der Block mit dem Objekt darin mit warmer Gelatine aufgekittet wird, empfiehlt er sein künstliches Hollundermark: die in Wasser gequollene Gelatine wird mit 1/4—1/2 ihres Volumens an Rizinusöl tüchtig durchgeschüttelt und dicht vor dem Erkalten in eine Schale ausgegossen; wird dann durch 90 %igen Alkohol das Oel ausgezogen, so bleibt die Gelatine als sehr feinporige, nicht elastische Masse zurück.

Apáthy (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1897 p. 718) bringt die Objekte aus Wasser in eine dünne Glyceringelatine, lässt aus dieser in einem Exsiccator bei der zum Flüssighalten gerade erforderlichen Temperatur das Wasser verdunsten, giesst die Masse in Metallrahmen (oben p. 73) aus und härtet sie in absol. Alkohol, schneidet sie auch unter diesem.

149. Gelatine nach Klebs oder **Glyceringelatine** (Arch. Mikr. Anat. 5. Bd. 1869 p. 165): konzentrirte Lösung von Hausenblase wird mit dem halben Volumen Glycerin gemischt.

150. Gelatine nach Kaiser (Bot. Centralbl. 1. Jahrg. 1880 p. 25). Ein Gewichtstheil feinste französische Gelatine wird etwa zwei Stunden lang in 6 Theilen Wasser eingeweicht, dann mit 7 Theilen Glycerin vermischt, und auf je 100 g des Gemisches wird 1 g Karbolsäure zugesetzt. Dann erwärmt man unter stetem Umrühren 10—15 Minuten lang, bis alle Schlieren, die von der Karbolsäure herrühren, vergangen sind. Man filtrirt die warme Lösung durch ganz feine Glaswolle, die vorher in Wasser gewaschen und noch nass in den Trichter gelegt worden war.

151. Gelatine nach Gerlach für ganze Embryonen u. s. w., nicht für Schnitte (Beitr. Morphol. Morphogen. 1. Bd. Stuttgart 1884 p. 118): Gelatine 40 g, konzentrirte Lösung von arseniger Säure 200 ccm, Glycerin 120 ccm. Mit Eiweiss zu klären. Die Masse hält sich in gut verschlossenen Flaschen Jahre lang. Die in Alkohol gehärteten Objekte werden vorher mit verdünntem Glycerin (1 Theil Glyc. und 2 Theile Wasser) so lange durchtränkt, bis aller Alkohol entfernt ist.

152. Gelatine nach Nicolas (Bibliogr. Anat. Paris 3. Année 1896 p. 274; Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 218). Die in Müllers Gemisch konservirten und sorgfältig unter der Wasserleitung ausgewaschenen Objekte (Gehirne und Stücke des Rückenmarks von kleineren Hunden und Katzen, Augen von Schweinen, 3—4 cm grosse Embryonen von Schafen) werden in warme Gelatine eingebettet: zuerst bei 25 ° C. in eine sehr dünne (3—5 %), nach je 1 Tag bei 35 ° in 10 % ige und in 20—25 % ige, die mit 8—10 % Glycerin versetzt ist; in letzterer bleiben sie 2—3 Tage, werden dann in Papierkapseln ausgegossen und, sowie die Gelatine nicht mehr flüssig ist, in eine 5 % ige Lösung von Formaldehyd (also Formol 1, Wasser 7 Theile) gebracht. Hierin wird die Gelatine nach einigen Tagen schneidfähig wie Celloidin und zugleich unlöslich, kann auch Monate lang unverändert in Wasser aufbewahrt werden. Beim Färben der Schnitte nimmt aber die Gelatine die Farbe mit auf und hält sie hartnäckig fest. Auch werfen sich die Schnitte beim Uebertragen in die stärkeren Alkohole leicht, lassen sich aber in „Cresylol“ wieder glätten und dann direkt in Balsam bringen. Der Einschluss in Glycerin ist natürlich ganz einfach.

8. Kapitel.

Einbetten in Kollodium (Celloidin) und andere kalte Massen.

153. Vortheile des Kollodiums oder Celloidins. Beide Substanzen erfordern keine Wärme, und das kann bei manchen sehr zarten Objekten wichtig werden. Ferner brauchen die Objekte vor dem Einbetten nicht in ein Vorharz gebracht zu werden, und das ist bei sehr umfangreichen Stücken ein Vortheil. Auch sind beide Substanzen ganz durchsichtig, erleichtern daher die Orientirung der Objekte. Besonders gut sind sie für sehr grosse Objekte, denn das Durchtränken mit Kollodium ist auch für die zartesten Elemente ganz unschädlich und darf daher nöthigenfalls Wochen lang dauern, während diese in einem Paraffinbade von der gleichen Dauer geradezu zerkocht sein würden. Endlich aber braucht die Masse als ganz durchsichtig aus den Schnitten vor dem Färben und Einschliessen nicht entfernt zu werden, sondern wird die Gewebe bei diesen Manipulationen auf das Beste schützen und brüchige oder isolirte Theile der Schnitte zusammenhalten, die sonst auseinanderfallen und verloren gehen würden.

Indessen zwei Nachtheile sind doch vorhanden: 1) dauert das Einbetten in Kollodium oder Celloidin sehr lange; gewöhnlich gehen drei Tage damit hin, wo für Paraffin eine Stunde genügen würde (über die rasche Methode von Gilson s. § 167); 2) lassen sich nicht so dünne Schnitte machen wie mit Paraffin[1]; mir sind nur noch solche von 7 μ geglückt, und die sind bei vielen Arbeiten zu dick.

[1] Apáthy hat schon 1889 eine Methode publizirt, wonach sich Serien von 5 μ dicken Schnitten durch Objekte von 1 qcm Schnittfläche gewinnen lassen. Neuerdings (Mikrotechnik p. 122) versichert er sogar, durch Celloidin und gewisse Objekte darin Serien von 2--3 μ dicken Schnitten ausgeführt zu haben, giebt aber sein Verfahren noch nicht an. Immerhin dürfte so viel feststehen, dass selbst Schnitte von 5 μ sich durchaus nicht immer leicht werden erhalten lassen, es sei denn, man gebiete über die Erfahrungen von Apáthy. Auch Mitrophanow (Arch. Z. Expér. (3) Tome 3 1896 p. 617) macht Schnitte von 5 μ Dicke durch Objekte in Photoxylin. S. ferner unten § 166 die Angaben von Gage. [M.]

Aus diesen Erwägungen möchte ich das Recht ableiten, die Kollodium-Methode nicht unter die allgemeinen Methoden einzureihen, sondern unter die speziellen zu verweisen. Besonders empfehle ich aber die noch junge Praxis des Aufhellens vor dem Schneiden und des Trockenschneidens (s. § 166 und 168).

154. Kollodium, Celloidin und Photoxylin. Das Kollodium, eine Auflösung von Schiessbaumwolle (Pyroxylin) in Alkohol plus Aether, hat zum Einbetten zuerst Duval (Journ. Anat. Phys. Paris 15. Année 1879 p. 185) verwandt. Das Celloidin, das von (Merkel und) Schiefferdecker empfohlen wurde (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. f. 1882 p. 199) ist nur eine besonders reine Schiessbaumwolle, die nach einem eigenen Verfahren hergestellt wird. Man erhält es entweder direkt von Schering in Berlin oder von Grübler & Hollborn oder andern Verkäufern von mikroskopischen Reagentien ,und zwar in Tafeln von zäher Konsistenz und etwas milchigem Aussehen. Stücke von einer solchen Tafel löst man entweder in Aether oder Aether + Alkohol zu einem Kollodium von beliebiger Dicke auf, besser jedoch schabt man sie nach Apáthy (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 164) in dünne Späne, trocknet diese an der Luft, bis sie gelb, durchsichtig und hornig geworden sind, und löst sie erst dann in Alkohol + säurefreiem Aether auf. So bekommt man die Lösungen frei von dem Wasser, das im ungetrockneten Celloidin vorhanden ist, und in Folge davon nach dem Härten eine Masse, die durchsichtiger ist und sich auch besser schneidet.

Zwar ist gewöhnliches Kollodium ein vorzügliches Material zum Einbetten, aber Celloidin ist angenehmer im Gebrauch und liefert auch bequemer Lösungen von bestimmter Stärke. Abgesehen hiervon sind beide Stoffe sich ziemlich gleich, und so werden denn auch in diesem Buche die Ausdrücke Celloidin und Kollodium ohne Unterschied gebraucht. — Ueber die Verwendung der Schiessbaumwolle s. § 166.

Photoxylin (Krysinsky in: Arch. Path. Anat. 108. Bd. 1887 p. 217; Busse in: Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 47; Mitrophanow in: Arch. Z. Expér. (3) Tome 3 1896 p. 617) ist trocken, sieht wie Baumwolle aus und steht chemisch dem Celloidin nahe. Man erhält es von Schering oder Grübler & Hollborn. In einem Gemisch gleicher Theile von absol. Alkohol und Aether löst es sich klar und wird genau wie Celloidin gebraucht. Sein Vortheil besteht darin, dass es auch nach dem Härten in 85%igem Alkohol völlig durchsichtig bleibt. Indessen Celloidin oder gewöhnliches Kollodium geben auch ganz durchsichtige Massen, wenn man die Blöcke aufhellt, wie ich es anempfehle (s. § 166—168); nach dieser Richtung hin gewährt es also keinerlei Vortheil, falls man nicht etwa nach der alten Methode verfahren will. Auch Apáthy (Mikrotechnik p. 120)

hält die Einführung des Photoxylins für keinen Fortschritt. Obregia dagegen (Neur. Centralbl. 9. Bd. 1890 p. 295) lässt es für Schnittserien vortheilhafter sein.

155. Vorbereitung der Objekte. Die Objekte müssen zunächst sehr sorgfältig in absolutem Alkohol entwässert werden und kommen dann zu sorgfältiger Durchtränkung in Aether oder besser in ein Gemisch von Alkohol und Aether. Duval (l. c.) nimmt auf 10 Theile Aether 1 Theil Alkohol; Schiefferdecker (und die meisten Forscher) gleiche Theile; Tulby (Nature Vol. 47 1892 p. 51) 4 Theile Aether und 1 Theil Alkohol. Indessen kommt hierauf nicht viel an. Ueberhaupt darf man die Objekte, wenn sie leicht permeabel sind, auch direkt vom Alkohol in das Kollodium bringen.

156. Das Kollodiumbad. Jetzt müssen die Objekte zunächst mit dickem Kollodium durchtränkt werden, und zu diesem Behufe kommen sie erst in eine dünne Lösung, die etwa 4—6 % getrocknetes Celloidin (§ 154) enthält, während die dicke 10—12 % hat.

Nimmt man Kollodium, so vermischt man es, um die dünne Lösung herzustellen, mit Aether, verwendet man Celloidin oder Photoxylin, so löst man es in einer Mischung von Alkohol und Aether zu gleichen Theilen auf. Leider lösen sich die Späne von trocknem Celloidin nur sehr langsam. Elschnig (Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 443) lässt sie daher zuvor 24 Stunden bloss in der nöthigen Menge Alkohols aufquellen und setzt dann den Aether zu; alsdann löse es sich viel rascher. Mir hat dies nach einem Versuche auch so geschienen.

Busse (Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 47) giebt folgende Vorschriften für die Bäder: für das schwächste 10 Gewichtstheile Photoxylin oder ganz trocknes Celloidin auf 150 Theile Alkohol und Aether; für das mittelstarke 10 auf 105, und für das ganz starke 10 auf 80 Theile (zum schwächsten Bad kann man auch ein schon gebrauchtes nehmen).

Ich verwende gewöhnlich zwei Lösungen: eine schwache und eine starke, letztere entspricht etwa der mittelstarken von Busse, denn seine ganz starke ist so dick, das sie die Objekte nur äusserst langsam durchdringt.

Im 1. Bade muss das Objekt so lange bleiben, bis es ganz sorgfältig durchtränkt ist; das kostet sogar für kleine Objekte Tage, und für grosse (z. B. menschliche Embryonen von 6—12 Wochen) Wochen oder Monate. Enthält es Hohlräume, so öffne man diese, damit sie ja sicher gefüllt werden. Ist es nun in der dünnen (oder in den dünnen, wenn man mehr als eine braucht) gut durchtränkt,

so wandert es in die dickste. Dies kann auch so geschehen (wie zuerst in der 1. Auflage dieses Buches 1885 p. 194 beschrieben), dass man die dünne langsam dicker werden lässt (etwa indem man unter den Deckel des Gefässes ein Stück Papier schiebt) und in dem Maasse, wie sie verdunstet, durch dicke ersetzt.

157. Einbetten. Kann das Objekt (etwa wie in § 162 angegeben oder sonst wie) auf der Objektklammer des Mikrotoms direkt befestigt werden, ohne dass man dazu einen Block von Kollodium von besonderer Form braucht, und ist solch ein Block auch nicht wegen der Orientirung des Objektes oder zur Erzeugung von Schnittserien nöthig, so braucht man es nicht besonders einzubetten, sondern kann sofort zur Härtung schreiten. Mit anderen Worten: es wäre Zeit verschwendet, wollte man erst einen eigenen Block von Kollodium um das Objekt herstellen, falls dies nicht aus den obigen Gründen erwünscht ist. Anderen Falles muss man es aber, wenn es nicht schon geschehen ist, jetzt einbetten, d. h. ihm in dem dicken Kollodium und in dem Gefässe für die Härtung die richtige Lage geben. Die allgemeinen Handgriffe hierfür s. im § 129. Ich empfehle hierzu die runden Kapseln aus Papier, jedoch darf ihr Boden nicht aus Kork bestehen, denn dieser würde in der Objektklammer nachgeben und die Masse sammt dem Objekt deformiren. Man nehme also zur Kapsel weiches Holz und bringe dann gleich einen Tropfen Kollodium darauf, den man trocknen lässt; so verhindert man später das Aufsteigen von Luftblasen aus dem Holz in das Kollodium.

Man kann die Objekte auch auf Leder oder Hollundermark befestigen, die aber vorher ebenfalls mit einer Schicht trocknen Kollodiums versehen worden sind. Ferner sind gute Gefässe zum Einbetten Uhrgläser oder die tiefen Porzellannäpfchen für Wasserfarben u. s. w., alle aber müssen ganz trocken sein.

Treten trotz aller Vorsicht beim Einbetten im Kollodium doch Luftblasen auf, so muss man sie vor dem Härten entfernen, etwa indem man das Ganze in einem Exsiccator oder sonst gut schliessenden Gefässe 1 oder 2 Stunden lang Dämpfen von Aether aussetzt. Jedoch darf der Aether, den man auf den Boden des Gefässes giesst, die Masse nicht benetzen (Busse in: Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1892 p. 467).

158. Orientiren des Objektes. Will man die Lage des Objektes im Kollodium bezeichnen, um es hinterher auf dem Objekthalter des Mikrotoms

leichter orientiren zu können, so mag man sich an die Methode von Eycleshymer (Amer. Natural. Vol. 26 1892 p. 354) halten. Das Objekt wird in einer der oben § 129 beschriebenen Messingformen eingebettet; aber deren Wände haben in regelmässigen horizontalen Abständen kleine Löcher, die einander gegenüberliegen, und durch diese zieht man Seidenfäden straff hindurch, klebt sie dann aussen am Messing mit je einem Tropfen Celloidin fest und lässt sie noch etwa 5 cm lose herabhängen. Diese freien Enden werden mit dünnem Celloidin durchtränkt, das man vorher mit Russ vermischt hat. Das Objekt wird nun auf dem Fadengitter orientirt, dann das Celloidin eingegossen und Alles gehärtet. Nach dem Härten löst man die Celloidintropfen mit etwas Aether auf und zieht die geschwärzten Enden durch den Rahmen hindurch; so bleibt unter dem Objekte eine Reihe schwarzer Linien, die zur Orientirung dienen können.

Apáthy (Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 47) ordnet die Objekte auf einem kleinen rechtwinkligen Streifen Gelatine, der zu unterst in das Einbettgefäss gelegt wird. Die Gelatine wird später mitgeschnitten, und ihre Kanten bilden gute Linien zur Orientirung. Halle & Born (Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1896 p. 364) benutzen Täfelchen von gehärtetem Eiweiss, worin sie zur Aufnahme der Objekte mit einem eigenen Instrument eine schmale Furche geschnitten haben.

159. Vorläufiges Härten. Von Rechts wegen wäre dies der nächste Schritt, aber er wird in Wirklichkeit oft schon vorher gethan. Denn die Vorgänge bei der Celloidinmethode gehen so ineinander über, dass sie sich nur schwierig abgrenzen lassen. Sind die Objekte also ordentlich in der dicken Lösung untergebracht (§ 156), so werden die Gefässe oder Kästchen etc. unter eine Glasglocke gesetzt, die der Luft gerade so viel Zutritt gönnt, dass der Aether und Alkohol langsam verdunsten können. Oder man legt auf die kleinen Porzellanschalen etc. einen nicht dicht schliessenden Deckel.

Sobald nun das dicke Kollodium (man darf nur so viel genommen haben, dass das Objekt eben bedeckt war) so weit verdunstet ist, dass das Objekt gerade herausschaut, so fügt man etwas dicke Lösung zu und überlässt von Neuem das Ganze sich selbst. (Sollte die erste Schicht zu trocken geworden sein, so muss man sie mit einem Tropfen Aether anfeuchten, bevor man das Kollodium hinzugiesst.) Jedenfalls muss man auch jetzt wieder die Verdunstung langsam vor sich gehen lassen, entweder wie oben angegeben, oder vielleicht besser so, dass man die Objekte unter eine h e r m e t i s c h schliessende Glocke bringt, die man nur 1 oder 2 mal täglich einige Sekunden lang abnimmt. (Zuweilen habe ich mit Vortheil unter diese Glocke neben die Objekte eine Schale mit Alkohol gesetzt, um den Aether durch eine Atmosphäre

von Alkohol hindurch verdunsten zu lassen; so besonders bei sehr grossen Objekten.) Der ganze Prozess aber wird, falls nöthig, 2 oder 3 Tage lang von Zeit zu Zeit wiederholt.

Ist die Masse so fest geworden, dass der Ballen (nicht der Nagel) des Fingers keinen Eindruck mehr hinein macht, so sticht man sie aus der Schale oder Form heraus (oder, falls sie in Papier war, lösst man dieses ab) und härtet sie definitiv (§ 160). Sollte sie aber noch nicht hart genug sein, um sich ohne Schaden herausnehmen zu lassen, so legt man sie auf 1 bis 2 Tage in schwachen Alkohol (von 30—70 %).

160. Definitives Härten. Von den verschiedenen Methoden zur definitiven Härtung möchte ich die von Viallanes (Ann. Sc. N. (6) Tome 14 1883 p. 129) mit Chloroform für kleine Objekte empfehlen, da sie rascher wirkt als die mit Alkohol und die Masse wenigstens ebenso gut härtet. (Schiefferdecker in: Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1881 p. 506 findet das nicht.) Für grosse Objekte dagegen soll sie der Alkoholmethode nachstehen, da die rasche Härtung der äusseren Schichten die Diffusion zu den inneren verhindert.

Man bringt also die Objekte in Chloroform, und hier gesteht nun das Kollodium zur Konsistenz von Wachs, wird elastisch, also nicht brüchig, ferner ganz durchsichtig und erhält genau den Brechungsindex von Glas. Mitunter genügen hierzu einige Stunden; meine Objekte haben nie mehr als 3 Tage gebraucht, aber die Länge der Zeit variirt so ganz unberechenbar, dass sich keine Regel geben lässt. Das Kollodium wird oft, wenn es in das Chloroform kommt, undurchsichtig, erlangt aber später seine Transparenz wieder.

Kleine Objekte kann man in Chloroform härten, ohne sie vorher durch Verdunstenlassen gehärtet zu haben. Man braucht nur die Masse einige Sekunden an die Luft zu stellen, bis sich eine Haut darüber gebildet hat, und darf sie dann gleich in das Chloroform bringen. Ist die Masse in einem Reagensglase, dann füllt man dieses voll Chloroform und lässt es 2—3 Tage stehen; alsdann ist das Kollodium schon recht hart und zugleich etwas geschrumpft, kann also leicht aus dem Reagensglase herausgeschüttelt und in ein weiteres Gefäss mit neuem Chloroform gebracht werden, wo es etwa 6 Tage bleiben muss und dann gewöhnlich zum Schneiden gut ist. Oft geht dies aber viel rascher. Gutes Chloroform ist jedoch nöthig, denn enthielte es Wasser, so würde es nicht taugen.

Die angegebenen Methoden sind zwar ausgezeichnet, indessen härte ich jetzt doch fast immer in Chloroform-Dampf. Man braucht nur die flüssige Masse (über die Entfernung der Luftblasen s. §. 157) in ihrem Gefäss in einen Exsiccator zu bringen, der auf dem Boden einige Tropfen Chloroform enthält. Dies wirkt sehr rasch, und die Masse wird schliesslich mindestens ebenso hart wie mit Alkohol (s. auch § 168).

Häufiger wird mit Alkohol gehärtet. Man legt die Objekte hinein und belässt sie darin, bis sie die richtige Konsistenz haben (1 Tag bis mehrere Wochen lang). Das Gefäss mit dem Alkohol darf aber nicht fest verschlossen sein, sondern muss wenigstens zum Theil offen stehen.

Ueber die Stärke des Alkohols variiren die Angaben sehr, aber die Experimente von Busse (Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 49), die ich bestätigen kann, haben diesen Punkt definitiv erledigt. Nach Busse ist etwa 85 %iger der beste, sowohl für die Durchsichtigkeit als auch für die Konsistenz der Masse. Aber beim Schneiden muss letztere stets feucht gehalten werden, da sie sehr rasch durch Verdunstung hart wird.

Apáthy (Mikrotechnik p. 122) hält nach wie vor seine Methode, in Alkohol von 70—80 % zu härten, für die allerbeste und verwendet Chloroform nur, wenn es sich um die doppelte Einbettung in Celloidin und Paraffin (§ 169) handelt. Glycerin benutzt er nur ausnahmsweise.

Auch frieren kann man die Masse lassen. Sie wird zuerst durch Alkohol gehärtet, dann auf einige Stunden in Wasser gebracht, um den meisten Alkohol zu entfernen (aber ja nicht allen, sonst möchte die Masse zu steif gefrieren). Darauf kommt sie einen Augenblick in Gummischleim, damit sie auf dem Gefriertische des Mikrotoms festhält, und wird durchfroren. Die Schnitte legt man in warmes Wasser. Sollte die Masse zu steif gefroren sein, so wärmt man vor dem Schneiden das Messer mit warmem Wasser an.

Florman (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 184) vermeidet bei der definitiven Härtung Alkohol und Chloroform ganz. Er schneidet die Blöcke aus, dreht sie um und lässt sie ruhig weiter abdunsten, wie oben angegeben. Ich habe diese Methode ebenfalls in der 1. englischen Auflage dieses Buches beschrieben. Ohne Zweifel hat Florman Recht, wenn er von seiner Methode eine bessere Härtung der Masse erwartet, aber diese wird kaum erheblich härter werden können, als mit Chloroform oder Alkohol, ohne in unerwünschter Weise zu schrumpfen. Blum (Anat. Anzeiger 11. Bd. 1896 p. 724) verwendet zum Härten des Celloidins „mit Formol versetzten dünnen Spiritus“.

Wie man nach der von mir vorgezogenen Methode des Aufhellens vor dem Schneiden härtet, findet man unten § 168 beschrieben.

161. Aufbewahren der Blöcke. Die gehärteten Blöcke können bis zu ihrer Verwendung in Alkohol von 70 % bleiben oder auch trocken aufbewahrt werden, indem man sie in geschmolzenes Paraffin taucht (Apáthy in: Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 45). Zahlen oder andere Bemerkungen lassen sich mit einem weichen Bleistift auf den Boden der Papierkästchen oder mit einem gelben Fettstift auf den Boden der Uhrgläser schreiben. Nach dem Härten und Herausnehmen der Objekte finden sie sich dann im Kollodium abgedrückt vor.

Apáthy (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1897 p. 732) legt die Blöcke nach dem Abspülen mit Wasser in Glyceringelatine, auf die er dann gegen den Schimmel einige Stückchen Thymol bringt; vor dem Schneiden nimmt er diese wieder fort, erwärmt die Gelatine gelinde, wäscht den Block mit lauem Wasser ab und schneidet ihn sofort, wobei er das Messer mit Alkohol von 95 % befeuchtet.

162. Schneiden. Ist das Objekt ungefärbt, so wird es in Kollodium so durchsichtig, dass es sich oft nur schwer für das Schneiden orientiren lässt. Man färbt daher das Kollodium ein wenig, gerade nur so viel, dass seine Umrisse auf den Schnitten sichtbar werden, und nimmt dazu entweder Pikrinsäure oder eine andere brauchbare Farbe, die man in Alkohol löst und entweder dem Kollodium oder dem Vorharze (Bergamottöl) beimischt.

Der Block wird auf dem Mikrotom befestigt wie folgt. Man nimmt ein Stück weiches Holz (oder für sehr kleine Objekte Hollundermark), das gut in die Objektklammer hinein passt, und bestreicht es mit Kollodium, das man dann trocknen lässt. Nun schneidet man den Block (oder das durchtränkte und gehärtete, aber nicht besonders eingebettete Objekt) unten glatt, benetzt diese glatte Fläche erst mit absolutem Alkohol und dann mit Aether (oder lässt sie trocken werden), giebt einen Tropfen sehr dickes Kollodium auf das Stück Holz (oder Mark) und drückt die benetzte (oder getrocknete) Fläche fest darauf. Dann bringt man das Ganze in Alkohol von 70 % auf einige Stunden (auch kürzere Zeit) oder in Chloroform oder seine Dämpfe auf einige Minuten, um die Kittstelle hart werden zu lassen.

Dr. L. Johnson theilt mir mit, nach seinen Erfahrungen sei hierzu sehr zweckmässig der Kitt, den die Metalldreher zum Aufkitten der metallenen Gegenstände auf das Holzfutter brauchen. Dieser besteht etwa aus 1 Theil Wachs und 2 Theilen Kolophonium. Will man ihn

brauchen, so muss der Celloidinblock unten ganz trocken sein; man erwärmt dann den Objekthalter ein wenig, womöglich über einer Flamme, lässt ein paar Tropfen von dem geschmolzenen Kitt darauf fliessen und presst nun den Block darauf, der in einigen Sekunden fest sitzen wird.

Für grosse Objekte darf man ja keinen Kork zum Einsetzen in den Objekthalter nehmen, namentlich wenn dieser wie ein Schraubstock geht, denn der Kork giebt nach, das Kollodium auch, und so wird das Objekt deformirt. Ist der Objekthalter hingegen ein Hohlcylinder, wie bei den neueren Jungschen Mikrotomen, so ist das nicht so schlimm, und da kann ein guter Kork schon gehen, aber Holz ist auch dann besser. Gage hat Stücke von Glascylindern empfohlen, Jelinek (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 237) das Stabilit, eine Art Hartgummi, die für elektrische Isolirungen angewandt wird. Man erhält es in brauchbarer Form von R. Jung in Heidelberg, wahrscheinlich auch von Grübler & Hollborn in Leipzig.

Das Messer muss beim Schneiden gehörig mit Alkohol von 50 bis 85 oder sogar bis 95 % benetzt werden. Irgend eine Tropfvorrichtung ist dazu gewiss gut. Apáthy räth an, das Messer mit gelbem Vaselin einzufetten; es schneide besser, werde vom Alkohol nicht angegriffen, und dieser sei auf der Schneide nicht so leicht beweglich. Man spannt das Messer so wenig quer wie möglich ein. Sehr brüchige Schnitte kann man mit Kollodium bestreichen (§ 139).

Man bringt die Schnitte entweder sofort in Alkohol (von 50—85 oder 95 %) oder, falls man sie in Serien anordnen will, so behandelt man sie, wie im folgenden Kapitel (§ 202 ff.) angegeben ist.

163. Färben. Die Schnitte können nun gefärbt werden, entweder frei oder aufgeklebt (auf Glas oder Papier); im Allgemeinen ist es aber nicht nöthig, nicht einmal erwünscht, das Celloidin vor dem Färben aufzulösen, denn es färbt sich gewöhnlich entweder gar nicht mit oder giebt doch die Farbe nachher im Alkohol wieder ab. Einige Farbstoffe jedoch tingiren es stark und gehen später nicht wieder ordentlich heraus; in solchen Fällen muss man es also vorher mit absolutem Alkohol oder Aether aus den Schnitten wegschaffen.

164. Einschliessen. In Glycerin kann man direkt einschliessen, und das Kollodium wird darin glashell. Dasselbe gilt vom Balsam. Man entwässert die Schnitte in Alkohol von 95—96 % (nicht in absolutem, denn der greift das Kollodium an). Nikiforow (Zeit. Wiss.

Mikr. 8. Bd. 1891 p. 189) empfiehlt ein Gemisch von absolutem Alkohol und Chloroform zu gleichen Theilen. Als Vorharz nimmt man natürlich eine Flüssigkeit, die das Kollodium nicht angreift. Am meisten werden hierzu empfohlen Origanumöl (§ 118), Bergamottöl (es heisst, die Schnitte schrumpfen darin etwas), Sandelöl, Lavendelöl, Cedernöl (wirkt ausgezeichnet, aber langsam), Chloroform, Xylol oder Benzol (nicht gut entwässerte Schnitte können darin schrumpfen) oder Dunhams Gemisch von 3—4 Theilen weissem Thymianöl mit 1 Theil Nelkenöl (über das Thymianöl s. ebenfalls §§ 118, 119). — Fish (Proc. Amer. Micr. Soc. Vol. 15 1893 p. 86) räth ein Gemisch von 1 Theil rothem Thymianöl mit 3 Theilen Rizinusöl an; letzteres soll dabei nur die Flüchtigkeit des Thymianöls vermindern. Nach einem Briefe an mich vom Juni 1895 ist Fish jedoch auch zum weissen Thymianöl übergegangen und findet es zum Orientiren besser.

Einige Sorten Nelkenöl lösen Kollodium sehr langsam, mögen daher gebraucht werden, aber empfehlen möchte ich es doch nicht. Origanumöl wirkt nach den Sorten ganz verschieden: einige nehmen den Alkohol nicht gut weg, andere lösen das Kollodium auf, noch andere machen es runzelig. Minot (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 175) giebt an, Dunhams Gemisch wirke sehr rasch und mache das Celloidin just so weich, dass es nicht runzelig werde, was die Anwendung von reinem Thymianöl so lästig mache.

Flesch empfiehlt Kreosot aus Buchenholztheer. Nach Weigert (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 480) wirkt ein Gemisch von 3 Theilen Xylol und 1 Theil wasserfreier Karbolsäure gut, darf aber nicht bei basischen Theerfarbstoffen gebraucht werden, da es sie auszieht; bei solchen ersetze man die Karbolsäure durch Anilin. Eycleshymer (Amer. Natural. Vol. 26 1892 p. 354) räth ein Gemisch von Bergamottöl, Cedernöl und Karbolsäure zu gleichen Theilen an. Anilin schafft sogar 70%igen Alkohol fort, aber wenn man es selbst hinterher nicht sorgfältig entfernt (durch Einlegen der Schnitte auf 24 Stunden in Chloroform), so werden später die Präparate braun. Eine Uebersicht über diese Mittel giebt van Gieson in: Amer. Month. Micr. Journ. Vol. 8 1887 p. 49 oder in: Journ. R. Micr. Soc. London f. 1887 p. 519.

165. Rückblick auf die ältere Celloidin-Methode. Die oben beschriebene Methode ist äusserst langwierig und lästig. Das Durchtränken der Gewebe mit dem Kollodium erfordert Tage oder gar Wochen und das Härten beinahe eben so viel Zeit. Die Masse ist dann undurchsichtig oder höchstens durchscheinend, aber nicht durchsichtig; ferner muss sie unter Alkohol geschnitten, oder wenigstens muss sie und das Messer konstant mit Alkohol benetzt werden. Bringt man dagegen nach der neuen Methode (§ 166—168) die Masse vor dem Schneiden in ein Vorharz, so wird einem grossen Theil dieser Mängel

abgeholfen: die Masse ist klar wie Glas und erlaubt die vollständigste Orientirung des Objektes, ferner kann sie, wie ich gezeigt habe (Lee & Henneguy, Traité 1896 p. 230), gut trocken geschnitten werden, was das Schneiden sehr erleichtert. Gilson endlich kürzt mit seiner neuesten Schnellhärtung die Operation wesentlich ab, und so wird Alles fast so einfach und kurz wie bei der Paraffinmethode. Ich kann mir nicht denken, dass wer die neue Methode je anwendet, gern zur alten zurückkehrt.

166. Die neue Methode mit dem Aufhellen vor dem Schneiden. Sie ist, glaube ich, zuerst von Bumpus (Amer. Natural. Vol. 26 1892 p. 80; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1892 p. 438) angegeben worden. Er durchtränkt den Block nach der Härtung in Chloroform mit weissem Thymianöl oder sonst einem guten Vorharz (§ 164), benetzt ihn dann unten mit Aether, klebt ihn mit dicker Celloidinlösung auf Holz auf (§ 162) und bringt ihn so in Chloroform, um die Kittstelle fest werden zu lassen. Mit dem Vorharze benetzt er aber nicht nur das Messer, sondern auch die Oberfläche des Blocks nach jedem Schnitte. E. Meyer (Biol. Centralbl. 10. Bd. 1890 p. 508) durchtränkt den Block in 24 Stunden mit Glycerin und benetzt das Messer entweder mit Glycerin oder Alkohol von 50—70 %. Eycleshymer (Amer. Natural. Vol. 26 1892 p. 354, 563) empfiehlt zum Durchtränken Karbolsäure, Glycerin oder sein Gemisch (§ 164). Gilson benutzt (nach brieflicher Mittheilung) seit einiger Zeit Cedernöl (s. unten § 167). Aehnlich Fish (§ 164). Alle diese Forscher schneiden feucht, d. h. sie benetzen das Messer. Ich finde hingegen, man schneidet viel besser trocken (s. unten § 168.)

Gage (Trans. Amer. Micr. Soc. Vol. 17 1896 p. 361) verwendet statt des Celloidins die billigere Schiessbaumwolle in einer schwachen und einer starken Lösung: Aether und 95 %iger Alkohol je 50 ccm, Schiessbaumwolle 1½ resp. 6 g. Die Objekte kommen aus dem Aetheralkohol auf 2—3 Stunden in die dünne, dann auf wenigstens 4—5 Stunden in die dicke Lösung, schliesslich auf einen Kork; dieser wird, sobald die Oberfläche hart zu werden beginnt, mit dem Objekt nach unten auf Chloroform zum Schwimmen gebracht. Nach einigen Stunden wird das Chloroform durch den „clarifier“, ein Gemisch von 3 Vol. Xylol und 1 Vol. Rizinusöl, ersetzt, und hierin wird das Kollodium absolut durchsichtig, falls es nicht etwa beim Einbetten durch den Athem oder die feuchte Luft Wasser angezogen hatte. Das Messer wird möglichst längs gestellt und liefert, wenn es gut ist, von Objekten, die nicht über 8 mm hoch und 5 mm breit und lang sind, bequem Schnitte von 5—6 μ. Messer und Objekt werden dabei mit einem Gemisch von 4 Vol. Xylol und 1 Vol. Rizinusöl feucht gehalten. Die Schnitte werden (nach Apáthy, s. § 206) auf dem Messer geordnet, mit Kloset- oder Cigarettenpapier abgehoben, auf den Objektträger

angedrückt und mit Aether (§ 203) festgeklebt. Sie wandern dann in eine Schale mit gewöhnlichem Benzin, von da nach einigen Minuten in 95 %igen Alkohol auf 5 Minuten, endlich, wenn man wässerig färben will, direkt in Wasser (und nach dem Auswaschen der Farbe aus Wasser direkt wieder in den starken Alkohol); so werden alle schädlichen Diffusionsströme vermieden, weil das viele Wasser den Alkohol sofort wegspült (und umgekehrt). Der Alkohol wird durch ein Gemisch von Karbolsäure (2 Theile) mit Terpentinöl (3 Theile) oder Xylol (3 Theile) in einigen Minuten entfernt, und dann giebt man den Balsam darauf.

167. Schnellhärtung nach Gilson (La Cellule Tome 6 1890 p. 123; einige Aenderungen beruhen auf brieflicher Mittheilung vom April 1892). Das Objekt wird entwässert, mit Aether durchtränkt und in ein Reagensglas mit Kollodium oder dünner Celloidinlösung gebracht. Das Glas kommt dann in geschmolzenes Paraffin zu stehen, und so dickt man das Kollodium, das ja schon bei niedriger Temperatur kocht, bis zum Syrup (etwa bis auf $^1/_3$ seines Volumens) ein. Dann wird es ausgegossen, auf einen Block von gehärtetem Celloidin gebracht und mit diesem in Chloroform oder einem Gemisch von Chloroform und Cedernöl etwa 1 Stunde lang gehärtet. War es in reinem Chloroform gewesen, so muss es erst noch mit Cedernöl durchtränkt werden, sonst aber kann es direkt in das Mikrotom gespannt und geschnitten werden; dabei wird das Messer und nach jedem Schnitte auch der Block mit Cedernöl benetzt.

Diese Methode ist, wie man sieht, viel rascher als die alte, denn 1) dauert das Celloidinbad, da es warm ist, nur noch kurze Zeit: kleine Objekte werden in 1 Stunde gut, wo früher Tage gebraucht wurden; 2) geht auch die Härtung viel rascher vor sich als mit Alkohol, in dem sie wenigstens 24 Stunden kostete. Der niedrige Siedepunkt des Kollodiums erfordert auch nur eine so geringe Wärme, dass die Gewebe darunter nicht leiden können.

168. Trockenschneiden. Als eine weitere Verbesserung möchte ich folgende Methode empfehlen. Man durchtränkt das Objekt mit Kollodium oder Celloidin nach Gilson (eben geschildert) oder nach der alten Weise (§ 156); letztere ist allerdings viel langsamer, raubt dem Forscher aber auch nicht mehr Zeit, da die Objekte im Kollodium ja keiner Aufsicht bedürfen. Dann bringt man es entweder wie gewöhnlich direkt auf die Objektklammer des Mikrotoms oder bettet es in eine Papierkapsel, ein Farbenschälchen etc. ein und härtet es in Dampf von Chloroform wenigstens 1 Stunde lang (genügt meist für kleine Objekte) bis über Nacht. Zu diesem Zweck wird das Objekt — das definitiv in der

dicksten Lösung eingebettet, aber noch nicht an der Luft vorläufig gehärtet ist — in eine Steinachsche Siebdose oder einen Exsiccator gebracht, auf deren Boden man einen Theelöffel voll Chloroform ausgegossen hat. (Die Objekte können Monate lang hierin ohne Schaden bleiben.) Sobald die Masse an der Oberfläche hart genug geworden ist, nimmt man sie natürlich am besten aus ihrer Kapsel etc. heraus und legt sie ab und zu um, damit die Chloroformdämpfe gleichmässig einwirken können. Ist sie einigermaassen hart (man braucht nicht zu warten, bis sie ganz hart ist), so kommt sie in das Gemisch von Gilson, das aber zuerst aus 1 Theil Chloroform und 1—2 Theilen Cedernöl bestehen muss. Nach und nach wird dann von dem Oel zugesetzt, bis zuletzt nur noch reines Cedernöl da ist. So wie nun die Masse ganz durchsichtig ist, bringt man sie an die Luft, wo das meiste Chloroform verdunsten wird; man kann sie dann auf die Objektklammer mit einem Tropfen dicken Kollodiums (§ 162) aufkitten und entweder sofort schneiden oder in einer gut verschlossenen Flasche beliebig lange unverändert aufheben. Jedenfalls schneidet man trocken; die angeschnittene Fläche des Blocks trocknet selbst in Stunden nicht so aus, dass Schaden entsteht. Oft schneidet sich die Masse besser, wenn man ihr Chloroform an der Luft noch einige Stunden abdunsten lässt.

Härten kann man auch direkt in dem Gemisch von Chloroform und Cedernöl statt in Chloroformdämpfen, aber ich finde, die Härtung wird nicht so gut. Desgleichen kann man direkt mit reinem Cedernöl aufhellen, indessen geht das sehr langsam, während das obige Gemisch äusserst rasch wirkt.

169. Doppelte Einbettung in Kollodium und Paraffin. Diese komplizirte Methode ist, obwohl selten, für Objekte anzurathen, die sehr dünne Schnitte liefern sollen, aber zu brüchig für Paraffin allein sind.

Kultschitzky (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 48) durchtränkt das Objekt zuerst mit Kollodium, dann mit Oel von Origanum vulgare, bringt es in eine warme (höchstens 40° C.) Lösung von Paraffin in Origanumöl und zuletzt in Paraffin. Man kann trocken schneiden und den Block trocken aufheben. Ryder (Journ. R. Micr. Soc. London f. 1888 p. 512) nimmt statt des Oeles Chloroform.

Ide (La Cellule Tome 7 1891 p. 347, Tome 8 1892 p. 114) verfährt mit Erfolg so: er bettet das Objekt nach Gilson (§ 167) in Kollodium ein, kocht dieses in einem Reagensglase 40 Minuten lang, bringt es dann (dies gilt für kleine Objekte) auf 15 Minuten in 30° C. warmes Chloroform, das 1/4 Paraffin aufgelöst enthält, und zuletzt 10 Minuten lang in reines geschmolzenes Paraffin.

Field & Martin (Bull. Soc. Z. France Vol. 19 1894 p. 48; Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 6) empfehlen folgende gleichzeitige Einbettung: sie lösen trockenes Celloidin in einem Gemisch von absolutem Alkohol und Toluol zu gleichen Theilen, sodass das Ganze die Konsistenz von Nelkenöl annimmt, und sättigen dies dann mit Paraffin bei einer Temperatur von 20—25° C. Das Objekt durchtränken sie mit dem Alkohol und Toluol und bringen es darauf in obige Lösung; zuletzt betten sie es in Paraffin ein, und zwar entweder nach Bütschli mit Chloroform (oben p. 79) oder, indem sie die obige Lösung in der Wärme unter stetem allmählichem Zusatz von Paraffin verdunsten lassen.[1])

Sabussow (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p. 353) bettet kleine Turbellarien nach E. Meyer aus 95 %igem Alkohol zunächst in Photoxylin (je 24 Stunden lang in eine 1/2 %ige, 2 %ige und 5 %ige Lösung in 95 %igem Alkohol und Aether zu gleichen Theilen) ein, härtet den Phot.-Tropfen mit dem Objekt darin in Chloroform 24 Stunden lang, schneidet das überflüssige Phot. vom Objekt weg und erwärmt dieses je 1 Stunde lang erst in Chloroform und Paraffin bei 35°, dann in reinem Paraffin bei 55° C.

Mitrophanow (Arch. Z. Expér. (3) Tome 3 1896 p. 617) bringt die Objekte auf 1—3 Tage in eine 1/2- oder 1 %ige Lösung von Photoxylin, darauf zum Härten in Alkohol von 70 %, schneidet dann den Block genau zurecht, entwässert ihn in Alkohol von 95 %, durchtränkt ihn mit Bergamottöl, Origanumöl oder Chloroform, sättigt das Vorharz (mit dem Block darin) bei 35—38° C. mit Paraffin und schliesst den Block in Paraffin (von 48—52° Schmelzpunkt) ein. Schnitte lassen sich mit einem Minotschen Mikrotom bis zu 2 μ Dicke erhalten.

Andere kalte Massen.

170. Kalte Gelatine nach Brunotti (Journ. Bot. Tome 6 1892 p. 194; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1892 p. 706). Man löst 20 g Gelatine durch Erwärmen in 200 ccm dest. Wasser, filtrirt und setzt 30—40 ccm Eisessig und 1 g Sublimat hinzu. Bei 15° ist die Masse dickflüssig. Die Objekte werden mit verdünnter Masse (1 Vol. auf 2—3 Vol. Wasser) durchtränkt, dann in die unverdünnte Masse eingebettet und in Alkohol, Kaliumbichromat, Pikrinsäure etc. gehärtet. Mithin wird hierbei die Erwärmung ganz vermieden.

171. Gummiglycerin nach Joliet (Arch. Z. Expér. Gén. Tome 10 1882 Notes p. 43). Reines Gummi arabicum löst man in Wasser zu einem dicken Syrup auf, füllt damit ein Uhrglas nahezu an und vermischt damit 6—10 Tropfen Glycerin sorgfältig durch Umrühren. Wie viel Tropfen

[1]) Ich habe keine günstigen Resultate erhalten: von einer regelrechten Einbettung in Celloidin kann nicht die Rede sein, denn es dringt nicht gut ein, höchstens werden die Theile des Objektes durch Celloidin mit einander verklebt, und das mag ja unter Umständen vortheilhaft sein. Von anderer Seite wurde mir aber die Methode sehr gerühmt. [M.]

man nehmen muss, hängt vom Objekt und von der Jahreszeit ab und ist durch Versuche festzustellen: im Winter oder bei feuchtem Wetter kommt man mit weniger Glycerin aus als im Sommer oder bei trockenem Wetter. Oft ist es auch gut, das Objekt vorher mit Glycerin zu durchtränken, dann aber muss man demgemäss weniger Glycerin zum Gummi setzen.

Das Objekt wird in das Uhrglas gelegt, und das Ganze 1—4 Tage zum Trocknen hingestellt. Hat es die Konsistenz von Knorpel angenommen, so wird das Objekt mit etwas von der Masse in Form eines Blockes herausgeschnitten, umgekehrt und, bis es verwandt werden soll, wieder zum Trocknen hingelegt, entweder in die Nähe eines Ofens oder an die Sonne, am besten aber einfach an die Luft. Der Block kann, so wie er ist, fast unbegrenzte Zeit aufbewahrt werden, denn Gummi mit dem nöthigen Quantum Glycerin darin wird nie hart oder brüchig. Im Allgemeinen wartet man mit dem Schneiden so lange, bis das Gummi so hart geworden ist, dass es sich nicht mehr leicht biegen lässt; dies ist gewöhnlich in etwa einer Woche der Fall. Die Schnitte (wie Verf. schneidet, giebt er nicht an) befreit man auf dem Objektträger durch Wasser vom Gummi und schliesst sie dann in Glycerin ein.

Diese Methode mag gelegentlich bei so äusserst wasserreichen Objekten, wie Salpen und Ctenophoren, gute Dienste leisten.

172. Gummi arabicum nach Stricker (Handbuch d. Gewebelehre 1. Bd. 1871 p. XXIV). Man bettet das Objekt aus Alkohol in eine dicke Lösung von Gummi in einem Papierkästchen ein, bringt das Ganze in Alkohol und schneidet es nach 2—3 Tagen. — Diese einfache Methode ergiebt sehr gut schneidbare Massen, falls man den Alkohol von der richtigen Stärke, nämlich von etwa 80 %, nimmt (Mayer in: Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. 1880 p. 27).

173. Traubenzucker nach Robertson (Journ. Anat. Phys. London Vol. 24 1890 p. 230; Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 33). Wird vom Verf. gelobt, scheint aber sonst noch nicht in Gebrauch gekommen zu sein.

174. Schellack nach Hyatt (Amer. Micr. Journ. Vol. 1 1880 p. 8; Journ. R. Micr. Soc. London Vol. 3 1880 p. 320). Empfohlen zum Schneiden harter Chitingewebe, die aus mehreren Stücken bestehen (Legebohrer, Stachel etc.), da in dem Schellack alle Theile ihre natürliche Lage behalten. Eingebettet wird in dicke Schellacklösung, die man nach dem Verdunsten des Alkohols durch warmes Wasser erweicht und dann schneidet.

Schleifmassen.

175. Kopal nach G. v. Koch (Z. Anzeiger 1. Bd. 1878 p. 36). Man bereitet eine schwache Lösung von Kopal in Chloroform, indem

man Kopal mit Sand in einem Mörser verreibt, dann Chloroform darauf giesst und filtrirt. In diese Lösung bringt man die vorher gefärbten und gut entwässerten Objekte (nur kleine Stücke nehmen!) und lässt das Chloroform ganz langsam verdampfen, am besten, indem man das Gefäss auf eine Thonplatte mit einem brennenden Nachtlicht darunter stellt. Sobald die Lösung nun so dick geworden ist, dass ein Tropfen davon beim Herausnehmen Fäden zieht, die beim Erkalten brüchig werden, nimmt man die Objekte heraus und lässt sie zum raschen Erhärten mehrere Tage auf der Thonplatte liegen. Sind sie so hart geworden, dass man mit dem Nagel keinen Eindruck mehr hinein machen kann, so schneidet man mit einer Laubsäge Platten davon, schleift sie auf der einen Seite auf einem Abziehstein eben und kittet diese mit Kanadabalsam oder Kopallösung auf einen Objektträger, der wiederum einige Tage auf der warmen Thonplatte liegen muss. Endlich werden die Schliffe erst auf einem Schleifstein, dann auf einem Abziehstein dünn geschliffen und polirt, mit Wasser abgewaschen und in Balsam eingeschlossen.

Man kann die Objekte auch ungefärbt einbetten, den Kopal aus den Schliffen durch Chloroform ausziehen, diese, falls nöthig oder erwünscht, entkalken und dann färben. Mitunter kittet man auch wohl vortheilhaft den Schliff nach dem Ausziehen des Kopals mit hartem Kanadabalsam auf den Objektträger, entkalkt dann vorsichtig nur die hervorstehende Partie, wäscht sie aus und färbt sie.

Diese ursprünglich nur für Korallen ausgedachte Methode ist offenbar auf alle anderen Objekte ausdehnbar, in denen harte und weiche Gewebe innig miteinander verbunden sind, und hier gewiss von sehr grossem Werthe. In der That ist sie denn auch neuerdings von Weil und Röse zum Studium der Knochen und Zähne von Wirbelthieren verwandt worden, freilich mit leichten Aenderungen (statt des Kopals wird Balsam oder Dammarharz benutzt, s. § 797); s. auch den folgenden §.

176. Kanadabalsam nach Johnston-Lavis & Vosmaer (Journ. R. Micr. Soc. (2) Vol. 7 1887 p. 200) zum Schleifen von Poriferen mit den Weichtheilen. Von dem in absolutem Alkohol gehärteten Schwamm wird eine etwa 5—12 mm dicke Scheibe abgeschnitten, durchgefärbt, in Alk. abs. entwässert, ganz langsam (durch steten Zusatz von Benzol) in Benzol und von da ebenso vorsichtig erst in dünnen, dann in dicken Benzolbalsam gebracht. Dann bleibt sie 1 Tag an der Luft liegen

und wird nun in einem Luftbade (Boden und Wände aus Asbest, um die Wärme ganz gleichmässig zu vertheilen) bei etwa 80° C. in einigen Tagen oder Wochen getrocknet, bis der Balsam hart genug ist. Beim Schleifen wird der Stein mit Seifenlösung (in Alkohol von etwa 50 %) benetzt.

177. Schellack nach Giesbrecht (Morph. Jahrb. 6. Bd. 1880 p. 95) zum Schleifen von harten Kalkgeweben. Giesbrecht umgiebt die Stacheln von Seeigeln, nachdem er sie in absolutem Alkohol gekocht hat, mit einem dicken Cylinder von recht heissem geschmolzenem Schellack, schneidet diesen Cylinder mit der Laubsäge in dünne Scheiben, schleift und polirt letztere erst auf der einen Seite, kittet diese wieder mit Schellack auf einen Objektträger, schleift und polirt die andere Seite ebenfalls und schliesst den Schliff in Balsam ein. Oder den erst auf der einen Seite polirten Schliff befreit er durch kochenden absoluten Alkohol ganz vom Schellack, bringt ihn auf wenigstens 24 Stunden in eine schwache alkoholische Lösung von Fuchsin, dann in Wasser, um das Fuchsin in den Kanälen niederzuschlagen, trocknet ihn, kittet ihn mit hartem Balsam auf und bearbeitet nun auch die andere Seite wie oben. Aehnlich lassen sich Muschel-, Schnecken- und Rhizopodenschalen etc. behandeln. Auf die Weichtheile wird indessen hierbei keine Rücksicht genommen.

178. Kolophonium und Wachs nach Ehrenbaum (Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 414). Kolophonium 10 Theile, Wachs 1 Theil werden zusammen geschmolzen (das Wachs verringert die Sprödigkeit) und die Objekte damit durchtränkt, dann in der gewöhnlichen Weise dünn geschliffen. Die Masse wird erst mit Terpentinöl, dann mit Chloroform ausgezogen. Ebenfalls nur für harte Gegenstände (Schalen, Zähne etc.) ohne Weichtheile.

Gefriermassen.

179. Allgemeines. Ueber den Werth der Gefriermethode für histologische Zwecke lauten die Urtheile sehr verschieden. In der Regel wird sie von den Pathologen ebenso gerühmt wie von den Zoologen getadelt, von Jenen viel ausgeübt, von Diesen vernachlässigt. Jedenfalls kann sie nicht als eine allgemeine Methode gelten, mag aber in manchen Fällen gute Dienste leisten, namentlich wenn es sich um recht rasche Erlangung von einigen Schnitten zur Orientirung über den Bau eines kompakten Gewebes handelt. Zu unterscheiden ist aber dabei, ob man ganz frische Objekte ohne jeglichen Zusatz gefrieren lässt, oder konservirte, die dann vorher mit Wasser oder einer wässerigen Flüssigkeit durchtränkt werden müssen. In warmen Klimaten ist es übrigens namentlich im Sommer nur schwer möglich, überhaupt die Objekte so gut zum Gefrieren zu bringen, dass sie brauchbare Schnitte ergeben; speziell gilt dies für die frischen, da die Schnitte auf dem Messer sofort wieder aufthauen.

Um die Bildung von Eiskristallen in den Objekten möglichst zu verhüten, durchtränkt man diese mit einer Masse, die beim Gefrieren hart und zähe wird, z. B. mit einer Lösung von Gummi arabicum.

180. Gefrierenlassen frischer Gewebe. Solger (Bull. Accad. Med. Roma Anno 21 1895 p. 88; Unters. Naturl. Moleschott 15. Bd. 1895; Festschrift Gegenbaur Leipzig 2. Bd. 1896 p. 211) empfiehlt sehr das Schneiden gefrorener Objekte (Speicheldrüse, Thränendrüse, Niere, Leber etc.). Diese werden ganz frisch lediglich im eigenen Saft gefroren, aber jedes Stück nur einmal, und dann macht man aus freier Hand rasch möglichst viele Schnitte, bringt sie ohne jeglichen Zusatz auf den Objektträger, zieht gegen die Verdunstung um das Deckglas einen Wachsrand und untersucht sie sofort. Hat man viel Material, so kann man ein zweites Stück gefrieren lassen und die Schnitte nach Belieben konserviren. Man lasse aber nie das ganze Stück gefrieren, sondern nur bis zur Hälfte seiner Höhe (etwa 2 bis 3 mm hoch), entferne die ungefrorene Schicht und schneide nur die mittlere Zone.

181. Massen aus Gummi und Syrup. Hamilton (Journ. Anat. Phys. London Vol. 12 1878 p. 254) durchtränkt die Gewebe mit Zuckersaft (2 Theile Zucker, 1 Theil Wasser), legt sie eine Stunde vor dem Schneiden in dicken Gummischleim und umgiebt sie mit diesem auch auf dem Objekthalter des Mikrotoms. Cole (Journ. R. Micr. Soc. London (2) Vol. 4 1884 p. 318) verwendet direkt ein Gemisch von Gummischleim und Zuckersaft.

182. Andere Massen. Dextrinlösung nach Webb (Journ. R. Micr. Soc. London f. 1890 p. 113). Gelatine nach Sollas (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 24 1884 p. 163). Gelatine mit Gummi arab. und Traganth nach Jacobs (Amer. Natural. Vol. 19 1885 p. 734; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1885 p. 900). Eiweiss nach Rollett (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1896 p. 92). Anisöl nach Kühne (Centralbl. Bakt. Parasitk. 12. Bd. 1892 p. 28) und Moore (Amer. Month. Micr. Journ. 1894 p. 373; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1895 p. 247).

Plenge (Arch. Path. Anat. 144. Bd. 1896 p. 409) härtet die Gewebe einige Stunden bis Tage lang in 4%igem Formol, schneidet Scheiben von 1 mm Dicke ab und lässt sie gefrieren. Die Schnitte von 30—10 μ Dicke fängt er in Alkohol von 50% auf. — Ueber Erhärtung des Formols durch Resorcin bis zur Schnittkonsistenz, sodass sich kleine Objekte (z. B. Rückenmark) ohne Alkohol einbetten lassen, s. Döllken in: Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 33.

9. Kapitel.

Aufkleben der Schnitte.

183. Wahl der Methode. Alle im Folgenden beschriebenen Methoden sind in ihrer Art vorzüglich. Für die gewöhnlichen Arbeiten empfehle ich: 1) für schon gefärbte Paraffinschnitte Kollodium nach Schällibaum; 2) für Paraffinschnitte, die auf dem Objektträger gefärbt werden sollen, Eiweiss nach Mayer, falls aber die Schnitte stark gefaltet sind, oder falls das Eiweiss sich mit färben würde, Wasser (oder Alkohol); 3) für Celloidinschnitte Eiweiss nach Mayer, und für sehr grosse Schnitte die Methode von Weigert.

Methoden für Paraffinschnitte.

184. Aufkleben mit Wasser oder Alkohol. Dies scheint zuerst von Gaule (Arch. Anat. Phys. Phys. Abth. f. 1881 p. 156) ausgeübt worden zu sein, der den Objektträger mit Alkohol benetzte, dann die Schnitte darauf mit einem Pinsel voll Alkohol ausbreitete, sanft erwärmte, das Deckglas auflegte, mit Xylol das Paraffin entfernte und in Xylolbalsam einschloss. Die Methode ist später bedeutend verbessert worden und wird gegenwärtig entweder so ausgeführt, dass man die Schnitte sich auf warmem Wasser strecken lässt und dann erst auf den Objektträger bringt (s. unten p. 116), oder dass man umgekehrt sie erst auf den nassen Objektträger legt und dann durch Erwärmen streckt. Letztere Methode ist als die einfachere vorzuziehen. Man verfährt dabei am besten wie folgt.

Der gut gereinigte Objektträger wird, wenn es sich nur um wenige Schnitte handelt, mit Wasser tüchtig benetzt; man kann hierzu eine Tropfflasche oder einen reinen Pinsel benutzen. Die Schnitte werden dann aufgelegt und strecken sich schon jetzt einigermaassen aus, wenn sie vorher etwas eingerollt gewesen waren; aber die feinen Falten verschwinden noch nicht. Man erwärmt nun den

Objektträger auf etwa 40 ° C., jedenfalls aber nicht so stark, dass das Paraffin schmilzt; dies thut man entweder auf einer schwach erwärmten Platte oder auf einem Wasserbade, kann es auch, obwohl man dabei sehr gut aufpassen muss, über einer kleinen Flamme besorgen. Haben sich dann alle Falten geglättet, so ordnet man die Schnitte, falls sie dabei auf dem Wasser umhergeschwommen sind, mit dem Pinsel nochmals, lässt durch allmähliches Neigen das Wasser vom Objektträger gut abfliessen und legt ihn zum völligen Trocknen bei Seite. Hat man keine Eile, so bleibt er über Nacht an einem staubfreien Orte liegen, und man kann ihn dann, nachdem man das Paraffin rasch geschmolzen hat, in Chloroform (oder Xylol etc.), von da in Alkohol von 100 °, 90 °, 70 °, dann in Wasser, in die Färblösungen u. s. w. bringen, ohne dass sich in der Regel die Schnitte ablösen werden. Hat man Eile, so trocknet man den Objektträger bei etwa 40 ° C.; dies kann in $^1/_2$ Stunde geschehen sein, besser aber wartet man, namentlich bei dicken Schnitten, einige Stunden.

Sind viele kleine Schnitte, von denen keiner aus der Reihe kommen darf, aufzukleben, so muss man das Wasser mit Vorsicht auf den Objektträger bringen. Dazu dient ein feiner Pinsel; man zieht damit unter Anhauchen des Glases einen Strich, der gerade für eine Reihe Schnitte ausreicht, legt diese hin, streicht nun erst für die zweite Reihe das Wasser auf, kurz, geht mit dem Wasser so sparsam um, dass möglichst wenig Gefahr für das Wegschwimmen der Schnitte bestehen kann. Zu wenig Wasser darf man jedoch auch nicht nehmen, denn die Schnitte sollen ja erst später alle auf einmal festgeklebt werden. Hier wird also an die Geschicklichkeit des Arbeiters stark appellirt. Hat man aber alle Schnitte glücklich in Reihe und Glied liegen, so lässt man mit dem Pinsel an Anfang und Ende jeder Reihe etwas Wasser hinzufliessen, damit die Schnitte sich ordentlich ausdehnen können, erwärmt den Objektträger und verfährt überhaupt wie oben angegeben. Mit einiger Uebung lassen sich viele Schnitte, auch wenn sie alle einzeln hingelegt werden (Schnittbänder machen natürlich lange nicht so viel Last), ganz sicher in schönster Ordnung festkleben, vorausgesetzt, dass das Wa ser sich auf dem Objektträger gut ausbreiten will und nicht in Tropfen zusammenläuft.

Die Reinigung des Objektträgers zu diesem Behufe ist nicht leicht und auch, wie mir scheint, nicht immer absolut sicher zu erreichen. Man hauche zuerst über das Glas hin und nehme es nur

dann in Gebrauch, wenn dabei der Hauch ganz gleichmässig auftritt und verschwindet, weil nur so das Wasser sich gut ausbreiten wird. Ist das aber nicht der Fall, so nehme man etwas Speichel, verreibe ihn mit dem (natürlich von Fett freien) Finger kräftig auf dem Glase, spüle ihn mit Wasser ab und benutze nun den Objektträger sofort, ohne ihn abzutrocknen. Heidenhain (Festschr. Kölliker Leipzig 1892 p. 114) reibt den Objektträger mit einem nassen Tuche gründlich ab, verfährt also ähnlich.

Suchannek (Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1891 p. 464) schiebt die Schuld für das Zusammenlaufen des Wassers auf die Gegenwart von Fett. Dies wird in der Regel zutreffen, indessen hilft auch mitunter das Reinigen mit Xylol und das Putzen mit einem ganz reinen Tuche nicht. Vielleicht trägt doch die Sorte des Glases mitunter Schuld daran. Jedenfalls haben alle irgendwie sauren Flüssigkeiten gar keine Neigung dazu, sich auf dem Glase ordentlich auszubreiten, während die alkalischen es viel eher thun. Ein Minimum von Mayerschem Eiweiss, mit dem Finger auf dem Objektträger verrieben, thut Wunder, ist aber nur dann zu empfehlen, wenn man die Schnitte nicht später in Flüssigkeiten zu bringen hat, die das Eiweiss auflösen (z. B. schlechtes Pikrokarmin). Auch Sobotta (Anat. Hefte 1. Abth. 8. Bd. 1897 p. 477) findet das Aufkleben mit Wasser nicht zuverlässig bei Präparaten aus Chromsäuregemischen oder für osmirtes Fett; er bestreicht daher den Objektträger vorher ganz dünn mit Eiweissglycerin.

Ob man zum Aufkleben der Schnitte destillirtes oder gewöhnliches Wasser nimmt, bleibt sich gleich, und man wird auch wohl nur äusserst selten bei der Weiterbehandlung der Schnitte (z. B. beim Färben) auf die Salze des gewöhnlichen Wassers Rücksicht zu nehmen brauchen. Dagegen ist das Wasser überhaupt bei gefärbten Schnitten durchaus nicht harmlos, greift vielmehr beim Strecken und langsamen Trocknen in der Wärme manche Farbe an oder zieht sie etwas aus. Man darf aber hieraus ferner darauf schliessen, dass es unter Umständen auch in den Schnitten selber Veränderungen herbeiführen wird, die nicht vernachlässigt werden dürfen.

In der Literatur ist uns ein Hinweis auf diese böse Eigenschaft des Wassers nicht begegnet; man scheint sie, da man gefärbte Schnitte wohl nicht damit aufklebt, bisher übersehen zu haben. Ein fernerer Uebelstand ist der, dass ein Erwärmen dicht bis an den Schmelzpunkt des Paraffins mitunter die Schnitte übermässig dehnt; namentlich gilt dies vom Bindegewebe. Indessen lässt sich diese Klippe ja leicht vermeiden. Heidenhain (l. c.) warnt ebenfalls vor zu starkem Erwärmen, da Kerne und Zellen alsdann sehr schrumpfen.

In der Regel haften die Schnitte, wenn sie sorgsam aufgeklebt wurden, fester am Glase als nach irgend einer anderen Methode. Absolut sicher haften sie jedoch nicht, und dass sich Gewebe, die mit Osmium- oder Chromgemischen fixirt sind, nicht so fest anlegen, wie

andere, gilt vom Aufkleben mit Wasser eben so sehr wie von dem mit Eiweiss. Alles in Allem genommen, darf man das Aufkleben mit Wasser, da es unzweifelhaft weniger leicht und rasch geht wie das mit Eiweiss, Schellack etc., nur dann empfehlen, wenn es auf gut gestreckte Schnitte ankommt oder wenn das Eiweiss sich mitfärben würde.

Nusbaum (Anat. Anzeiger 12. Bd. 1896 p. 52) klebt mit Brunnenwasser (oder destill. Wasser mit einer Spur Gummi arabicum) auf. Albrecht & Stoerk (Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 12) lassen die Schnitte auf dem Objektträger im kalten Wasser sich durch Anhauchen strecken, pressen sie dann mit glattem Filtrirpapier kräftig an, lösen sofort das Paraffin durch Xylol auf, verdrängen dieses durch absoluten Alkohol und giessen eine Lösung von Celloidin auf. die aber so dünn sein muss, dass man hinterher das Häutchen von Celloidin nicht merkt. Gulland (Journ. Anat. Phys. London Vol. 26 1891 p. 56) bringt die Schnitte auf warmes Wasser (oder warmen Alkohol) in einer Schale, taucht dann den Objektträger hinein und schiebt die Schnitte darauf (s. § 140). Im Uebrigen verfährt er ähnlich wie oben geschildert. S. auch im Nachtrag § 884.

185. Kollodium nach Schällibaum (Arch. Mikr. Anat. 22. Bd. 1883 p. 565). Von dem klaren Gemisch von 1 Vol. Kollodium mit 3—4 Vol. Nelkenöl (oder Lavendelöl) wird ein wenig mit einem Pinsel auf den Objektträger gestrichen. Hat man dann die Schnitte aufgelegt, so wird letzterer 5—10 Minuten lang auf dem Wasserbade erwärmt, bis das Oel verdunstet ist. Die Schnitte haften fest und können bis in Wasser gebracht werden, ohne sich abzulösen; auch färben sollen sie sich lassen: ich finde aber nicht, dass sie dafür sicher genug aufgeklebt sind. Auch erwärme ich den Objektträger nicht erst lange auf dem Wasserbade, sondern halte ihn einfach über eine kleine Flamme, bis das Paraffin schmilzt und das Oel sich in Tröpfchen zwischen den Schnitten ansammelt.

Nach Rabl (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 170), der 3 Theile Nelkenöl auf 2 Theile Kollodium nimmt, muss man alle 4—5 Tage sich diese Mischung frisch bereiten, und das Nelkenöl darf auch nicht lange am Licht gestanden haben. Bei dieser Vorsicht wird man keinen Schnitt verlieren, selbst nicht beim Färben in wässerigen Lösungen.

Ich selber halte Schällibaums Methode nicht für so sicher wie die von Mayer (§ 188), wenn die Schnitte gefärbt werden sollen, empfehle sie aber ihrer Einfachheit wegen für schon gefärbte Schnitte. Allerdings eignet sie sich nicht zum Strecken und Glätten der Schnitte.

Field & Martin (Bull. Soc. Z. France 19. Vol. 1894 p. 48) meinen, Xylol, Toluol oder Benzol mache das Kollodium leichter löslich in Alkohol, und empfehlen daher zum Lösen des Paraffins Petroleumäther.

Gallemaerts (Bull. Soc. Belge Micr. Vol. 15 1889 p. 56; Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 493) gebraucht unter Anlehnung an Drasch eine konzentrirte Lösung von Schiessbaumwolle in Aceton, die er mit absolutem Alkohol so weit wie nöthig verdünnt hat. Gage (Journ. R. Micr. Soc. London (2) Vol. 4 1884

p. 654) überzieht die Objektträger mit Kollodium, lässt sie trocknen und bepinselt sie dann beim Gebrauch mit Nelkenöl. Aehnlich Summers (Amer. Month. Micr. Journ. Vol. 8 1887 p. 73; Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 482); er legt aber die Schnitte trocken auf und lässt dann ein Gemisch von Alkohol und Aether zu gleichen Theilen darunter fliessen; sowie dieses verdunstet ist, haften die Schnitte fest.[1])

Strasser (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 45) empfiehlt ein Gemisch von 2 Theilen Kollodium, 2 Theilen Aether und 3 Theilen Rizinusöl, oder (ibid. 6. Bd. 1889 p. 153) 2 Theilen Kollodium und 1 Theil Rizinusöl; die aufgelegten Schnitte werden mit einem dickeren Gemisch (2—3 Theile Kollodium duplex und 2 Theile Rizinusöl) überstrichen, und der Objektträger wird dann ohne vorherige Erwärmung bis zur Lösung des Paraffins, d. h. auf 2—10 Stunden (in der Wärme etwas kürzere Zeit) in Terpentinöl gebracht. Dieses härtet das Kollodium (Benzol und Chloroform thun das auch). — S. auch Gebhardt in: Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 39 (Kombination der Methode von Strasser mit dem Aufkleben durch Wasser) und Blochmann (ibid. p. 189: Aufkleben mit Wasser auf Kollodiumhäute).

186. Kollodium-Papier nach Strasser (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 346). Eine sehr komplizirte Abänderung der Methode von Weigert für Celloidinschnitte (§ 207), nur zu gebrauchen mit dem Mikrotom von Strasser. Näheres in dessen Aufsätzen in: Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 346; 6. Bd. 1889 p. 154; 7. Bd. 1890 p. 290, 304; 9. Bd. 1892 p. 8; 12. Bd. 1895 p. 154.

187. Schellack nach Giesbrecht (Z. Anzeiger 4. Jahrg. 1881 p. 484). Man bestreicht die erwärmten Objektträger ganz dünn und möglichst gleichmässig mit einer nicht zu konzentrirten, filtrirten Lösung von Schellack in absolutem Alkohol, indem man in diese einen ziemlich dicken Glasstab taucht und ihn rasch über das Glas der Länge nach hinführt. Die Objektträger bewahrt man trocken auf; unmittelbar vor dem Gebrauch streicht man ein wenig Kreosot mit einem Pinsel ganz dünn darüber, legt dann die Schnitte auf und lässt im Wasserbade das Paraffin schmelzen und das Kreosot verdunsten, was etwa $^1/_4$ Stunde kosten wird. Nach dem Abkühlen wird das Paraffin mit Terpentinöl, das den Schellack nicht auflöst, weggeschafft und das Präparat in Kanadabalsam eingeschlossen.

Giesbrecht empfiehlt braunen Schellack zu nehmen, allerdings eine möglichst helle Sorte, aber keinen gebleichten, da dieser sich in Alkohol nicht löse. Später (Mitth. Z. Stat. Neapel 3. Bd. 1881 p. 184) nimmt er jedoch weissen, von dem es auch lösliche Sorten gebe, und verwendet statt des Kreosotes Nelkenöl. In seinem Berichte über die Methoden der Zool. Station zu Neapel lässt dann Whitman (Amer. Natural. Vol. 16 1882 p. 784) den Schellack im Verhältniss von 1 : 10 in absol. Alkohol lösen. Bourne (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 22 1882 p. 336) löst den Schellack direkt in warmem Kreosot und bestreicht damit den Objektträger. Mayer (Amer. Natural. Vol. 19 1885 p. 733) nimmt statt dessen konzentrirte Karbolsäure, löst heiss und filtrirt auch heiss (unter

---

[1]) Ich löse die Schiessbaumwolle direkt in Nelkenöl, halte übrigens die ganze Methode für wenigstens entbehrlich. [M.]

Erwärmung des Trichters): da er indessen später findet, dass die Karbolsäure in der Wärme des Wasserbades die Gewebe etwas angreift, so verwendet er (Internation. Monatschr. Anat. Phys. 4. Bd. 1887 p. 41) wieder die nach Giesbrecht mit alkoholischer Lösung bestrichenen Objektträger, bepinselt sie aber nicht mit Nelkenöl, sondern legt die Schnitte trocken darauf, drückt sie sanft an, dreht den Objektträger um und setzt ihn so etwa 1/2 Minute den Dämpfen von Aether aus. Diese erweichen den Schellack ein wenig, sodass die Schnitte festkleben.

Da Chloroform ebenfalls den Schellack löst, so darf der Balsam nicht damit verdünnt sein, wohl jedoch mit Terpentinöl, Benzol oder Xylol.

Zum Färben der Schnitte eignet sich die oben in ihren Wandlungen geschilderte Methode, die älteste aller Aufklebe-Methoden, nicht. Ich verstehe auch nicht recht, warum sie immer noch angewandt wird, da man jetzt doch bessere hat.[1])

188. Eiweiss nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 4. Bd. 1883 p. 521; Internation. Monatschr. Anat. Phys. 4. Bd. 1887 p. 42): Eiweiss und Glycerin je 50 ccm und Natriumsalicylat 1 g werden gut gemischt und in eine ganz reine Flasche filtrirt. Das Filtriren dauert Tage lang, aber das Gemisch verdirbt dabei nicht.

Man streicht auf den kalten Objektträger ein klein wenig von obigem Eiweiss auf, verreibt es gut mit dem vorher gut abgewischten Finger, legt die Schnitte auf — falls sie es vertragen, mag man sie

[1]) Ich meinerseits verstehe nicht, wie diese gute Methode so völlig hat ausser Gebrauch kommen können. Für Schnitte, die nicht weiter behandelt, auch nicht erst geglättet, sondern direkt in Harz eingeschlossen werden sollen, kenne ich keine bequemere. Auch jetzt wieder habe ich mich davon überzeugt, dass sie völlig zuverlässig ist: wenn die damit aufgeklebten Schnitte mehrere Tage lang senkrecht in Xylol stehen können, ohne sich loszulösen, so ist das doch Alles, was man verlangen kann! Und Alles, was man zu thun hat, ist: man überstreicht den gut erwärmten Objektträger mit Schellack, lässt ihn erkalten, legt die Schnitte darauf, drückt sie, wenn sie stark gefaltet oder gerollt sind, mit dem Pinsel sanft an, erwärmt in der Flamme bis zum Schmelzen des Paraffins und kann nun sofort Xylol darauf geben und in Xylolbalsam (oder Dammar) einschliessen. Das ganze Geheimniss dabei ist dieses: man verschaffe sich einen Schellack, der nach dem Erkalten auf dem Objektträger, wenn man den Finger darauf presst, nur einen ganz schwachen Eindruck davon bekommt. Ist er weicher, so kleben die Schnitte nicht recht fest, ist er härter, so thun sie es ebenfalls nicht, aber dann kann man durch Bestreichen mit Nelkenöl helfen. Ob er braun oder gebleicht ist, thut Nichts zur Sache. Die Lösung mache man in absolutem Alkohol (vom braunen im Verhältniss von 1:20, vom gebleichten 1:5), lasse absetzen, filtrire, lasse nochmals einige Tage gut absetzen und prüfe ihn dann sowohl mit dem Finger, als auch, indem man Schnitte, wie oben angegeben, damit festklebt und in Xylol aufstellt. [M.]

mit dem Pinsel sanft andrücken — und erwärmt nun den Objektträger einige Minuten auf dem Wasserbade. Uebrigens genügt es auch, den Objektträger nur einen Augenblick durch eine Flamme zu ziehen, sodass das Paraffin ordentlich schmilzt. Nachher wird dieses auf die gewöhnliche Weise mit Xylol, Chloroform etc. aus den Schnitten entfernt. Man darf aber, wenn die Schnitte nicht gefärbt werden sollen, nicht etwa direkt Balsam darauf geben, denn das Glycerin würde ja darunter bleiben und Trübungen verursachen, vielmehr müssen die Schnitte unter allen Umständen auch in absoluten Alkohol, und von hier entweder in die Färbgemische oder zurück in Xylol, Benzol etc. Das Glycerin hat allerdings nur den Zweck, das Eiweiss vor dem Eintrocknen auf dem Objektträger zu schützen, ist aber deswegen unentbehrlich.

Die Schnitte haften sowohl in alkoholischen als auch in wässerigen Flüssigkeiten absolut sicher, soweit nicht diese das Eiweiss lösen (z. B. Alkalien), und daher ist die Methode für Schnitte, die noch gefärbt werden sollen, warm zu empfehlen; noch dazu arbeitet man sehr rasch mit ihr. Sie hat aber mit der von Schällibaum und von Giesbrecht das gemein, dass sie gefaltete Schnitte nicht glättet, gerollte nicht streckt. Auch färbt sich das Eiweiss unter Umständen etwas mit (bei reinen Kernfärbungen nicht!), indessen wird dies nur selten eine Störung hervorrufen. Worin aber bei der Anwendung der Methode am ehesten gefehlt wird, ist, dass man gern viel zu viel Eiweiss unterstreicht; man verreibe es also gut mit dem Finger, und wische dann womöglich noch mit dem Ballen der Hand über den Objektträger hin; damit man hierbei nicht etwa seine eigenen Epithelzellen auf das Glas befördere, reibe man zuvor Finger und Ballen auf einem Tuche ab.

Es scheint vorzukommen, dass das Eiweissgemisch nach einiger Zeit trübe wird und verdirbt.[1]) Vosseler (Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1891 p. 457) macht darauf aufmerksam, dass es mit der Zeit dunkler und dünnflüssig werde und dann nicht mehr gut klebe; man möge es daher alle 6 Monate neu machen.[2])

Claypole (Proc. Amer. Micr. Soc Vol. 16 1895 p. 65) überzieht die Schnitte, wenn sie auf dem Eiweiss liegen, mit Kollodium und löst, wenn dieses

---

[1]) Mir ist das noch nicht geschehen, auch Vosseler nicht. [M.]

[2]) Auch dies habe ich nicht erlebt, vielmehr ist das Gemisch zwar braun geworden, hat aber seine Klebkraft beibehalten und sich sogar fast in eine Gallerte verwandelt. [M.]

trocken geworden ist, das Paraffin ohne vorheriges Erwärmen in Xylol auf. Als Grund hierfür wird angegeben, man erspare sich dabei eine Spirituslampe!

Grandis (Atti Accad. Lincei Rend. (4) Vol. 6 1890 Sem. 2 p. 138; Arch. Ital. Biol. Tome 14 1891 p. 412) zeigt, dass sich Eiweiss in Kontakt mit der gleichen Menge Glycerin beim Kochen sehr rasch, aber auch bei gewöhnlicher Temperatur zersetzt. Der dabei gebildete Körper koagulirt nicht mehr durch Hitze, ist jedoch in Alkohol unlöslich. In dem Mayerschen Gemisch war schon nach 2 Monaten das meiste Eiweiss zersetzt, nach 2 Jahren aber alles.

189. Wasser und Eiweiss. Die möglichen Kombinationen beider Methoden des Aufklebens mit Wasser und mit Eiweiss scheinen nachgerade alle verwirklicht zu sein, aber von Zeit zu Zeit wieder neu entdeckt zu werden.

Duval (Journ. Anat. Phys. Paris Tome 27 1891 p. 26) legt die Schnitte trocken auf den Objektträger, lässt stark verdünntes Eiweiss darunter fliessen, erwärmt bis zum Glattwerden der Schnitte und legt sie auf 24 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur zum Trocknen hin. Henneguy (ibid. p. 398) breitet auf dem mit Eiweiss bestrichenen Objektträger mit einem Glasstabe etwas Wasser aus, legt die Schnitte auf und trocknet sie nach der Glättung in 10—15 Minuten bei 40 ° C. Aehnlich verfährt Ohlmacher (Journ. Amer. Med. Ass. April 1893). Mann (Anat. Anzeiger 8. Jahrg. 1893 p. 442; Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 486) schüttelt Eiweiss mit dem 10fachen Volumen an Wasser 5 Minuten lang tüchtig, filtrirt es zweimal durch dasselbe Filtrirpapier und bestreicht damit einen Vorrath von Objektträgern, die er dann trocknen lässt. Die Schnitte lässt er sich auf Wasser von 40 ° C. ausbreiten (s. oben p. 116), hebt sie mit einem dieser Objektträger heraus, ordnet sie darauf, lässt das Wasser ablaufen, legt ihn zum Trocknen 5 Minuten lang in einen Wärmofen von 35 ° C. und entfernt endlich das Paraffin mit Xylol.

Die sogenannte Japanische Aufklebmethode, die Reinke (Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1895 p. 21) dem Japaner Ikeda zuschreibt, ist nur die von Henneguy.

190. Gummi arabicum nach Flögel (Z. Anzeiger 6. Jahrg. 1883 p. 565). 1 Theil Gummi wird in 20 Theilen Wasser gelöst, filtrirt und gegen das Schimmeln mit etwas Alkohol versetzt. Der Objektträger wird hiermit bestrichen, getrocknet und nach dem Auflegen der Schnitte angehaucht, um das Gummi klebrig zu machen; oder die Schnitte, namentlich grosse, kommen direkt auf den noch feuchten Objektträger. Dann wird das Paraffin aufgelöst und Balsam auf die Schnitte gegeben. Zum Nachfärben ist also diese Methode nicht geeignet.

Eine Methode zum Reinigen von Gummi arabicum giebt Waddington (Journ. Quekett Micr. Club Vol. 6 1881 p. 199; Journ. R. Micr. Sc. London (2) Vol. 1 1881 p. 704): die filtrirte Lösung wird in viel Alkohol gegossen, das ausgefällte „Arabin“ mit Alkohol auf dem Filter gut gewaschen, getrocknet, wieder in Wasser gelöst und zweimal filtrirt.

191. Gummi arabicum nach Frenzel (Arch. Mikr. Anat. 25. Bd. 1885 p. 51). Zu einer dünnen Lösung von Gummi in Wasser wird eine wässerige Lösung von Chromalaun, ferner etwas Glycerin und eine Spur Alkohol (l. c. p. 142) gesetzt. Hiermit wird der Objektträger wie gewöhnlich bestrichen, die Schnitte werden mit dem Pinsel sanft darauf angedrückt, dann angeschmolzen und höchstens 15 Minuten lang auf 30—45° C. erwärmt, um das Gummi unlöslich zu machen, sodass die Schnitte nachher auch in Wasser festhaften. Das Gummi soll sich auch in den meisten Färbgemischen nicht mitfärben, wohl aber in Fuchsin und Safranin.

192. Quittenschleim nach Born & Wieger (Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 346). 2 Theile offizineller Quittenschleim, 1 Theil Glycerin und eine Spur Karbolsäure.

193. Agar-Agar nach Gravis (Bull. Soc. Belge Micr. Vol. 15 1889 p. 72; Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 494). 1 Theil Agar-Agar in 1000 Theilen Wasser gelöst.

194. Gelatine. R. Perrier (Ann. Sc. N. (7) Tome 8 1890 p. 77) klebt die gefärbten Schnitte mit einer 2—3%igen, sorgfältig filtrirten Lösung von Gelatine auf, von der er so viel auf dem Objektträger ausbreitet, dass die Schnitte auch beim Strecken frei schwimmen können. Nachfärben lassen sich die Schnitte nur mit Farbstoffen (z. B. Methylenblau), die in absol. Alkohol oder gar in einem Gemisch von diesem und Nelkenöl gelöst sind; man muss auch ja darauf achten, dass die Gelatine sich nicht mitfärbt. Aehnlich Bürger (Fauna Flora Golf. Neapel 22. Monogr. 1895 p. 446); er bestreicht aber den Objektträger vorher noch mit Eiweissglycerin (nach Mayer) und konstatirt, dass die Schnitte in Alkohol von weniger als 70% nicht mehr haften.

195. Gelatine und Kaliumbichromat. Gray (The Microscope Vol. 9 1889 p. 325; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1890 p. 117) verwendet eine 1%ige Gelatinelösung, lässt den Objektträger mit den Schnitten über Nacht trocknen, bringt ihn dann in Xylol, Alkohol und zuletzt in eine 2%ige wässerige Lösung von Kaliumbichromat, um die Gelatine unlöslich zu machen. — Henneguy (Leçons sur la cellule. Paris 1896 p. 62) nimmt Gelatinelösung 1:5000 und setzt beim Gebrauch eine Spur Bichromat zu; den Objektträger mit den Schnitten trocknet er dann am Licht 2—3 Stunden lang.

196. Gelatine und Formol. Alleger (Proc. Amer. Micr. Soc. Vol. 15 1894 p. 192) macht die ½%ige Gelatinelösung durch Zusatz von etwas Formol unlöslich; die Färbung der Schnitte wird dadurch nicht beeinträchtigt. Aehnlich Eisen (Proc. Californ. Acad. Sc. Vol. 5 1895 p. 4; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1895 p. 486).

197. Gelatine nach van Walsem (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 229). Aeusserst komplizirt.

198. Zucker und Dextrin nach Obregia s. § 208.

199 u. 200. Guttapercha nach Frenzel und Kautschuk nach Threlfall (Z. Anzeiger 6. Jahrg. 1883 p. 51, 301, 423). Komplizirt, nicht ganz zuverlässig und jetzt wohl nicht mehr im Gebrauch.

Methoden für Schnitte, die nicht entwässert werden sollen.

201. Gelatine und Chromalaun nach Fol (Lehrbuch p. 132). 4 g Gelatine werden unter stetem Umrühren auf dem Wasserbade in 20 ccm Eisessig gelöst. Zu 5 ccm der Lösung giebt man 70 ccm Alkohol von 70 % und 1—2 ccm einer 5 %igen wässerigen Lösung von Chromalaun. Diese Mischung giesst man auf die Objektträger und lässt sie trocknen. In einigen Stunden wird die Gelatine unlöslich, quillt aber in Wasser noch auf und wird dann klebrig. Man taucht daher den Objektträger in das Wasser, worin die Schnitte schwimmen, bringt diese darauf und nimmt dann den Objektträger wieder heraus; sie haften dann fest. Besonders für grosse Celloidinschnitte geeignet, nach Fol auch für Zupfpräparate.

Methoden für Celloidinschnitte.

202. Eiweiss nach Mayer. Wie ich aus eigener Erfahrung weiss, lassen sich auch Celloidinschnitte mit Eiweiss aufkleben; man muss sie nur recht sorgfältig darauf andrücken. Das Celloidin kann man hinterher ruhig mit Aether und Alkohol auflösen.

203. Aether nach Summers (Amer. Month. Micr. Journ. Vol. 8 1887 p. 73; Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 482). Die Schnitte kommen auf 1—2 Minuten in Alkohol von 95 %, werden auf dem Objektträger geordnet und dann aus einer halbvollen Flasche mit den Dämpfen von Aether überfluthet. Das Celloidin wird sofort weich und ganz durchsichtig. Den Objektträger legt man darauf in 80 %igen oder sogar direkt in 95 %igen Alkohol. Die Schnitte sollen ganz fest kleben und sich färben lassen. Ich habe die Methode nicht sicher befunden. — Schiefferdecker (Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 507) räth an, wenn man die Schnitte färben will, die Objektträger vorher mit einer Schicht Kollodium versehen zu haben; sonst aber genüge ein reiner Objektträger. Die Behandlung mit Aetherdämpfen kann auch in einem Glase oder sonst wie geschehen. — Nach Gage (Proc. Amer. Micr. Soc. Vol. 14 1892 p. 82) überzieht man die Objektträger vorher

mit einer $^1/_2$ %igen Lösung von Eiweiss und lässt sie trocknen; das Kollodium haftet dann fester. (Die neuere Methode von Gage siehe oben § 166.)

Auburtin (Anat. Anzeiger 13. Bd. 1897 p. 90) lässt um das Objekt möglichst wenig Celloidin stehen, schneidet in 70 %igem Alkohol, entfernt diesen von den Schnitten auf dem Objektträger vorsichtig zuerst mit Fliesspapier, dann durch absoluten Alkohol und giesst nun reichlich Aether und Alkohol auf, damit sich das Celloidin ganz von den Schnitten löse und bei der Verdunstung auf dem Objektträger als dünne Membran niederschlage. Dann Alkohol von 70 %, Wasser, Färblösung etc.

204. Die Gelatine nach Alleger (s. oben § 196) eignet sich auch für Celloidinschnitte. — S. auch oben § 201, ferner Eycleshymer in: Amer. Natural. Vol. 26 1892 p. 354 und „zur Technik der Celloidinserien" Tandler in: Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 36.

205. Bergamottöl nach Apáthy (Mitth. Z. Stat. Neapel 7. Bd. 1887 p. 742; Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 46, 360). Das Messer bestreicht man vor dem Schneiden mit Vaselin (s. oben p. 103) und benetzt es dann mit 95 %igem Alkohol. Die Schnitte bringt man sofort auf Bergamottöl, das grün sein, nicht nach Terpentinöl riechen und mit 90 %igem Alkohol vollkommen mischbar sein muss (s. § 117). Sie breiten sich auf dem Oel ganz aus; bevor sie aber untersinken, zieht man sie mit einer Nadel einen nach dem anderen an ihren Platz auf einem Stück Pauspapier, das in das Oel eintaucht. (Das Papier schneidet man sich etwa so breit wie den Objektträger und dreimal so lang wie das Deckglas.) Ist die richtige Anzahl Schnitte auf dem Papier, so hebt man es aus dem Oel, lässt dieses ablaufen, trocknet die andere Seite des Papiers auf Fliesspapier, legt es dann mit den Schnitten auf den ganz trocknen Objektträger und drückt es mit Fliesspapier darauf an. Rollt man es nun langsam auf, so bleiben die Schnitte auf dem Glase und werden mit einem Streifen glatten Löschpapieres, den man darüber legt und andrückt, vom überschüssigen Bergamottöl befreit. Sind sie schon gefärbt, so legt man sie direkt in Balsam ein, sollen sie aber erst noch gefärbt werden, so setzt man sie nach Entfernung des Bergamottöls den Dämpfen von Alkohol und Aether einige Minuten lang aus, bringt sie auf $^1/_4$ Stunde in Alkohol von 90 % und kann sie nun ohne Gefahr in Gemischen färben, die 70 %igen oder stärkeren Alkohol enthalten. Müssen sie dagegen in wässerige Flüssigkeiten, so sind die Schnitte auf dem Papier so zu ordnen, dass das Celloidin an den Rändern sich deckt, damit sie durch

den Aetherdampf alle zu einer einzigen Membran zusammenkleben. Diese löst sich dann im Wasser vom Glase ab und kann nun wie ein einziger grosser Schnitt weiter behandelt werden.

Sind die Objekte sehr klein oder ungefärbt, so giebt man zum Bergamottöl ein wenig Safranin in Alkohol gelöst; so färbt sich das Celloidin der Schnitte in wenigen Sekunden und ist dann besser sichtbar. Nach dem Einlegen in Balsam verschwindet diese Farbe in einigen Tagen wieder.

206. Apáthy's neuere Methode (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 168) ist in einigen Beziehungen bequemer als die vorige. Das Messer wird mit dem Finger tüchtig, aber gleichmässig mit gelbem Vaselin eingefettet und mit Alkohol von 70—90 % benetzt. Jeder Schnitt wird sofort mit einer Nadel oder einem kleinen Pinsel auf eine trockene Stelle des Messers geschoben, und hier werden sie nun in Reihen geordnet, wobei sie sich mit ihren Rändern wenigstens berühren müssen, noch besser aber übereinander greifen. Sobald ein Raum von der Grösse des Deckglases voll ist (oder auch mehrere solche Räume), trocknet man die Schnitte durch Auflegen von Filtrirpapier ab (sie können daran nicht festkleben, weil sie auf dem Vaselin liegen) und bepinselt sie mit der ganz konzentrirten Celloidinlösung, wie sie zum Einbetten gebraucht wird, lässt sie zum Verdunsten 5 Minuten lang liegen und benetzt sie nun mit Alkohol von 70 %, damit man ruhig weiter schneiden kann, oder legt sie, wenn man nicht mehr schneiden will oder das Messer ganz voll ist, sammt dem Messer in Alkohol von 70 %. Dieser härtet das Celloidin zu einer einzigen Membran, die man mit einem Skalpell leicht vom Messer wegnehmen und nach Belieben weiter behandeln kann. Am besten legt man sie aber gleich auf den Objektträger, klebt sie darauf an den Rändern mit Aether und Alkohol fest und bringt sie in das Färbgemisch.

207. Kollodium nach Weigert (Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1895 p. 490). Man benetzt beim Schneiden das Messer mit Alkohol, jedoch nicht so sehr, dass der Schnitt schwimmt. Dann tränkt man einen Streifen Klosetpapier (porös aber zäh) von etwa der doppelten Breite des Schnittes mit Alkohol, fasst ihn an beiden Enden, streckt ihn etwas und lässt ihn auf den Schnitt herunter; dieser klebt gleich daran und kann so über die Schneide hin heruntergezogen werden. Den 1. Schnitt nimmt man mit dem Ende des Papieres auf, das man mit der linken Hand hält, und lässt die anderen sich von links nach rechts daran

reihen. Jedesmal nach dem Aufheben eines Schnittes legt man, um weiter schneiden zu können, das Papier auf einen Pack von mehreren Lagen Filtrirpapier, der mit Klosetpapier bedeckt, mit Alkohol durchtränkt ist und in einer Schale liegt. Sind alle Schnitte glücklich auf dem Papier, so beginnt das 2. Stadium, nämlich das Ueberziehen mit Kollodium.

Zunächst werden die Schnitte auf eine Glasplatte (für wenige oder kleine Schnitte ist das ein Objektträger) übertragen, die man vorher, wie es die Photographen thun, mit einer dünnen Schicht Kollodium überzogen hat. (Solche Platten kann man vorräthig halten.) Man legt das Papier umgekehrt darauf, sodass die Schnitte auf das Kollodium kommen, drückt es sanft glatt an und nimmt es sorgfältig ab; die Schnitte haften auf dem Kollodium. Man bringe aber höchstens zwei Reihen Schnitte auf die Platte, damit sie nicht trocken werden, bevor mehr dazu kommen, sondern nehme gleich mit Fliesspapier allen Alkohol von den Schnitten fort, giesse Kollodium darüber und lasse es sich zu einer ebenen Schicht ausbreiten. (Sobald dies oberflächlich trocken ist, kann man mit einem Pinsel voll Methylenblau irgend welche Notizen darauf schreiben, die auch bei allen weiteren Manipulationen nicht verlöschen werden.) In diesem Zustande darf man die Platte unter 80 %igem Alkohol bei Seite legen oder gleich färben. In wässerigen Färbgemischen lösen sich beide Kollodiumblätter vom Glase los, halten aber die Schnitte zwischen sich fest und lassen sich nun bequem färben, auswaschen, entwässern und in Balsam bringen, nur darf man keinen stärkeren Alkohol als 96 %igen verwenden. Weigert empfiehlt als Vorharz das im § 164 angegebene Gemisch von Karbolsäure und Xylol. Natürlich dauern alle Prozesse wegen des Kollodiummantels länger als bei freien Schnitten.

Man schneidet sich von der Schnittreihe die richtige Länge für das Einlegen in Balsam zurecht, solange sie noch in Alkohol ist, oder noch besser, man bringt sie zum Zerschneiden eigens auf Klosetpapier, das voll Alkohol ist.

Strasser meint, gummirtes Papier sei besser als die Glasplatten, besonders bei sehr grossen Schnitten; s. § 186.

Wintersteiner (Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 316) reiht die Schnitte nicht erst lange auf dem Papier auf, sondern lässt sie vom Messer direkt auf die Glasplatte gleiten.

208. Methode von Obregia (Neur. Centralbl. 9. Bd. 1890 p. 295; in etwas anderer Form bei Gulland in: Journ. Path. London 1893).

Man überzieht Objektträger oder grössere Glasplatten mit einem Gemisch von 3 Maasstheilen Zuckersyrup, 2 Theilen Alkohol von 95 % und 1 Theil Dextrinsyrup (muss durchsichtig sein) und lässt sie 2—3 Tage zum Trocknen liegen, bis sie, mit dem feuchten Finger berührt, gerade noch kleben. (Das Dextrin verhindert den Zucker am Kristallisiren.) Die Paraffinschnitte werden darauf gelegt und 10 Minuten lang auf 57—60° erwärmt; dann wird die Platte in Xylol (oder Terpentinöl), von da auf einige Minuten in absoluten Alkohol gebracht und, nachdem man diesen hat abtropfen lassen, mit Photoxylinlösung übergossen. Nach 10 Minuten wird sie in Wasser getaucht, worin sich die Photoxylinhaut mit den Schnitten bald vom Glase ablöst. Die Celloidinschnitte hingegen bringt man zunächst auf ein Blatt satinirtes Seidenpapier, das, mit der satinirten Seite nach oben, in einer Schale liegt und darin mit 95 %igem Alkohol feucht gehalten wird, nimmt dann das Papier aus der Schale, legt es umgekehrt auf den vorbereiteten Objektträger, drückt mit Fliesspapier die Schnitte auf ihn an, übergiesst sie mit einer 3 %igen Lösung von Photoxylin, lässt sie an der Luft trocknen und löst sie durch Untertauchen in Wasser als eine zusammenhangende Platte vom Glase ab.

Die Methode von Obregia hat den Vortheil, dass sie auf alle Arten Schnitte, auch auf solche aus gar nicht eingebettetem Material, anwendbar ist.

209. Kollodium und Gelatine nach Giacomini (Gazz. Clin. Milano 1885; Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 531) für grosse Schnitte zur Erforschung der gröberen Verhältnisse des Centralnervensystems.

10. Kapitel.

Allgemeines über das Färben.

210. Arten des Färbens. Man kann die Farbstoffe eintheilen in solche, die diffus färben, d. h. alle Elemente eines Objektes, und in solche, die spezifisch oder elektiv färben, d. h. nur einzelne Elemente durch Färbung hervorheben, die übrigen aber entweder gar nicht oder weniger stark oder in einem anderen Ton tingiren. Eine solche Differenzirung zu erreichen, ist der Hauptzweck des Färbens.

Diese Differenzirung kann eine histologische sein: dann tritt durch Färbung ein ganzes Gewebe oder eine Gruppe von Gewebselementen hervor, und der Rest des Präparates bleibt farblos oder ist wenigstens anders gefärbt, z. B. bei einer gut gelungenen Färbung der Nervenenden mit Goldchlorid. (Diese Art Färbung bezeichnet man gewöhnlich als spezifisch.) Sie kann aber auch eine cytologische sein: dann färben sich entweder nur die Zellkerne oder nur die übrigen Bestandtheile aller Zellen im Präparate.

Die Farbstoffe, die eine besondere Affinität zur Substanz der Zellkerne zeigen, die Kernfarbstoffe, sind gegenwärtig bei Weitem die wichtigsten, wenigstens für den Zootomen. Denn dieser will meist nicht so sehr wie der Histologe den feineren Bau der Zellen färberisch differenziren, um diese an und für sich zu studiren, sondern er will die Zellkerne durch ihre Farbe in dem ungefärbten Gewebe so hervorgehoben wissen, dass sie ihm gewissermaassen als Grenzsteine dienen, um bequem die Konturen und sonstigen Beziehungen der Elemente verfolgen zu können, zu denen die Kerne gehören; und die übrigen Theile der Zellen lässt er absichtlich ungefärbt, damit sie möglichst wenig Licht absorbiren. Vielleicht ist das irrationell, aber bisher hat es sich in der Praxis als ungemein förderlich für allgemeine Arbeiten bewährt.

Es giebt aber noch eine andere Gruppe von cytologisch elektiven Farbstoffen, nämlich die **Plasmafarbstoffe**. Diese — es sind ihrer nur wenige — werfen sich speziell auf gewisse Theile des Zellplasmas (Gerüstwerk, Granula, Polkörper etc.) und lassen meist die Kerne ungefärbt. Ich unterscheide daher 1. diffuse Farbstoffe, 2. elektive Farbstoffe, und zwar a) Kernfarbstoffe, b) Plasmafarbstoffe, c) histologisch elektive oder spezifische Farbstoffe. Jedoch habe ich diese Anordnung im Folgenden nicht beibehalten, vielmehr die Farbstoffe mehr nach ihrer chemischen Natur, und wie es sonst besser passte, aufgeführt.

211. Methoden zum Färben. Es giebt leider nur wenige Farbstoffe, die eine so starke Neigung zu bestimmten Gewebselementen haben, dass man sie ohne Weiteres zu elektiver Färbung verwenden kann. Gewöhnlich hat man hingegen nur zwischen zwei Methoden zu wählen. Nach der einen — der progressiven oder direkten — verwendet man eine Färblösung, die das hervorzuhebende Element rascher färbt als die anderen, die man ungefärbt haben möchte; man unterbricht also den Prozess und fixirt die Farbe in dem Element, sobald dieses stark genug gefärbt ist, der Rest hingegen gar keine oder doch nur wenig Farbe angenommen hat. Dies geschieht z. B., wenn man die Kerne mit einem ganz schwachen Hämateïnthonerde-Gemisch färbt: in einem bestimmten Moment hat man eine ziemlich reine Kernfärbung erzielt, lässt man aber das Gemisch noch länger einwirken, so färben sich auch die übrigen Bestandtheile der Zelle, und dann ist es um die elektive Färbung geschehen. Diese Methode leistet besonders gute Dienste beim Färben von ganzen Objekten, während dies die hauptsächlichsten Farbstoffe der anderen Klasse nicht vermögen. Es ist zugleich die alte Art der Färbung mit Karmin- und Hämateïngemischen.

Die andere Methode — die regressive oder indirekte — beruht darauf, dass man überfärbt und dann theilweise entfärbt. Man tingirt also zuerst das ganze Objekt diffus und wäscht darauf die Farbe überall da aus, wo sie nicht bleiben soll, während die Elemente, die man zu färben wünscht, kraft einer noch unverständlichen Affinität die Farbe hartnäckiger festhalten. Dies geschieht z. B. beim Färben mit Safranin: zunächst ist das ganze Präparat tief roth, wäscht man es aber einige Sekunden lang mit Alkohol aus, so bleibt die Farbe nur in den Kernkörperchen und dem Chromatin der Kerne erhalten. Hauptsächlich für diese Methode werden die Theerfarbstoffe verwendet. Im Allgemeinen

kann sie nur für Schnitte gebraucht werden, nicht für ganze Objekte, findet hier aber eine sehr weite Verwendung und giebt vielleicht die schönsten Resultate, die bisher erzielt worden sind.

212. Der Zustand der Gewebe vor dem Färben. In der Regel lassen sich scharfe Färbungen nur an sorgfältig fixirten Geweben erzielen. Todte, aber nicht eigens fixirte Gewebe färben sich allerdings, gewöhnlich aber nicht scharf; und lebendes Gewebe färbt sich in der Regel überhaupt nicht, sondern widersteht den Farbstoffen so lange, bis es dadurch getödtet ist (Ausnahmen s. im nächsten §).

Es ist wahrscheinlich, und dies hat, glaube ich, zuerst P. Mayer ausgesprochen, dass die gewöhnlichen Färbungen fixirter Gewebe auf zweierlei Art zu Stande kommen. Entweder resultiren sie aus der Verbindung des Farbstoffes mit organischen oder anorganischen Salzen, z. B. Phosphaten, die im lebenden Gewebe enthalten waren und nun vom Fixir- oder Härtemittel in situ niedergeschlagen werden; dies scheint der Fall zu sein, wenn man mit Alkohol fixirt. Oder sie resultiren aus der Verbindung des Farbstoffes mit gewissen chemischen Körpern, die im lebenden Gewebe nicht existirten, sondern sich erst bei der Konservirung aus den Bestandtheilen des Fixirmittels und denen des Gewebes bildeten; dies scheint z. B. vom Fixiren mit Chromsäure zu gelten, und die Verbindungen sind wohl hauptsächlich Metall-Albuminate.

Diese Betrachtungen zeigen, wie sehr die Art einer Tinktion von der vorherigen Behandlung der Gewebe abhängt.

213. Färben intra vitam. Einige Farbstoffe haben die Eigenschaft, lebende Zellen zu tingiren, ohne sie erheblich zu schädigen. So können in sehr schwachen Lösungen verwandt werden Cyanin (Chinolinblau), Methylenblau, Bismarckbraun, Anilinschwarz, ferner unter gewissen Bedingungen Dahlia, Eosin, Gentianaviolett, vielleicht auch Methylviolett und einige andere, die aber noch nicht genau genug erprobt sind. (Siehe hierüber Martinotti in: Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 305.) Nach Scholtz (Centralbl. Med. Wiss. 24. Jahrg. 1886 p. 449) ist Congoroth selbst in starker Lösung einigen Thieren nicht schädlich; so lassen sich z. B. lebende Rotatorien theilweise mit Erfolg intra vitam färben. Vor Kurzem hat Ehrlich das Neutralroth sehr empfohlen (s. § 310).

Die meisten von diesen Farbstoffen dürfen nur äussert verdünnt angewandt werden und nur in neutralen oder schwach alkalischen Flüssigkeiten, denn Säuren wirken ja giftig. So jedoch färben sie thatsächlich

manches Zellplasma intra vitam, niemals jedoch das Chromatin der Kerne; denn wenn sie dies färben, so ist das ein Zeichen des Todes. Die Farbe ist mitunter im ganzen Zellplasma diffus verbreitet, mitunter aber beschränkt sie sich auf Körnchen darin, die man vielleicht ohne gute Gründe für identisch mit den Granula von Altmann angesehen hat.

Nach Bethe (Biol. Centralbl. 15. Bd. 1895 p. 140) färben sich jedoch mit Methylenblau auch die Kerne in den lebenden Zellen der Ruderplättchen von Ctenophoren. — S. auch die vorläufige Mittheilung von Przemycki (ibid. 17. Bd. 1897 p. 321) und Loisel (C. R. Soc. Biol. Paris (10) Tome 4 p. 624 und 934).

Seit der Publikation der 3. englischen Auflage dieses Buches habe ich mich viel mit diesem Thema beschäftigt und bin zu demselben Schlusse gelangt wie Galeotti (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 172), nämlich dass die sogenannten Färbungen intra vitam gar keine echten Färbungen sind. Die oben erwähnte diffuse Farbe scheint, wenn die Zelle noch bei vollem Leben ist, nur auf der Absorption oder Imbibition der Färblösung durch die Zelle zu beruhen, nicht aber auf einer chemischen Verbindung des Farbstoffes mit irgend einem Bestandtheile der Zelle. Wenn nämlich eine so gefärbte Zelle in ein ungefärbtes Medium gebracht wird, so giebt sie die Farbe unverändert wieder ab; dies aber scheint doch zum Beweise dafür hinzureichen, dass die Farbe nur mechanisch in den Interstitien der Zellsubstanz festgehalten worden war. Die stärkere Färbung der Granula oder anderer Bestandtheile der Zelle mag hingegen doch eine echte Färbung im Sinne einer chemischen Verbindung sein; jedenfalls aber sind diese Färbungen unweigerlich an Körper gebunden, die keinen integrirenden Theil der lebenden Zelle ausmachen: die Zelle selbst mag am Leben sein, sie sind es nicht. Es sind wohl Nahrungstheilchen, die von aussen aufgenommen worden sind, oder Produkte des Stoffwechsels, die bald ausgestossen werden sollen; oder wenn sie wirklich einen integrirenden Theil des lebenden Gewebes ausmachen sollten, so haben sie wohl von der eindringenden Färblösung gelitten und sind deswegen oder aus anderen Gründen in ihrer Vitalität geschwächt, nie aber bestehen sie aus noch ganz lebenskräftiger Materie. So denke ich denn auch, der Hauptwerth der sogenannten Färbung intra vitam beruht darauf, dass sie uns die lebenden Bestandtheile der Zelle von den todten unterscheiden lehrt und uns auch unter den lebenden die zeigt, die relativ geringes Leben haben.

Abgesehen übrigens von dieser Frage, ob die sich färbenden Theilchen leben oder nicht, so muss man doch zugeben, dass die

Färbung intra vitam oft recht nützlich wird. Denn sie ermöglicht es uns oft, Zustände oder Elemente in den Geweben optisch zu differenziren, die man sonst am lebenden Objekte gar nicht oder nicht leicht erkennen könnte.

Ich selbst habe in dieser Beziehung Gentianaviolett, Dahlia und Methylenblau als Zusatz zu indifferenten Flüssigkeiten für äusserst nützlich bei der Untersuchung von Geweben befunden. Chinolinblau und Bismarckbraun sind wohlbekannte Hülfsmittel beim Studium der Infusorien und anderer Thiere. Methylenblau ist äusserst wichtig für Nerven (s. unten Kapitel 15) und nach meiner Erfahrung überhaupt von allen obigen Farbstoffen der nützlichste. Es ist nämlich auch in Salzlösungen völlig löslich und kann daher bei der Untersuchung von Seethieren einfach dem Seewasser beigemischt werden. Die anderen Farben sind das nicht genug, um praktisch verwendbar[1]) zu werden, aber Gentianaviolett und Dahlia werden es viel mehr, wenn man den Salzlösungen eine Spur Chloralhydrat — $^1/_4$ % ist reichlich genug — zusetzt. Alle genannten Farben aber lösen sich in Serum oder anderen „indifferenten" Flüssigkeiten, wenn man sie damit im Mörser anreibt.

Das Methylenblau lässt sich in den Geweben nach den Methoden fixiren, die im Kap. 15 angegeben sind, und liefert dann haltbare Präparate. Bismarckbraun fixirt man mit Chromsäure (0,2 %) oder Sublimat (P. Mayer) und kann hinterher noch mit Safranin färben, darf aber den Alkokol nicht lange auf das Präparat einwirken lassen.

214. Substantive und adjektive Farbstoffe; Beizen. Die technische Färberei unterscheidet zwei Klassen von Farbstoffen je nach ihrem Verhalten zu den Geweben: die Farbstoffe, die aus ihren Lösungen von der Wolle, Baumwolle, Seide etc. direkt aufgenommen werden, heissen substantive oder direkte, die anderen hingegen, die sich mit dem Gewebe nur dann verbinden, wenn dies vorher mit einer Beize (gewöhnlich einem Metallsalz oder einem -hydrat) behandelt worden ist, heissen adjektive oder Beizenfarbstoffe.

Die thierischen Gewebe haben in der Regel eine beträchtliche Affinität zu den Farbstoffen und nehmen sie direkt aus den Lösungen auf. Daher färbt man meist substantiv. Immerhin ist es, wie gesagt,

[1]) Dies gilt nicht vom Bismarckbraun, das sich nicht nur für Caprelliden (s. Fauna Flora Golf. Neapel 6. Monogr. 1882 p. 153), sondern auch für alle möglichen anderen Seethiere eignet und sogar bei Selachiern, die man darin leben lässt, in alle Gewebe eindringt. Uebrigens haben es bereits 1878 Brandt bei Süsswasser-Protozoen und Martinotti (l. c.) bei Kaulquappen mit Erfolg verwandt. [M.]

wahrscheinlich, dass viele Färbungen, die man ohne absichtliches Beizen der Gewebe erzielt, genau genommen doch adjektiv sind. Und zwar würde das allemal der Fall sein, wenn man zu der Annahme Grund hat, dass die Färbung das Resultat einer Verbindung des Farbstoffes mit einem Metallsalze oder -hydrat ist, das dem lebenden Gewebe nicht inhärirt, sondern ihm erst beim Fixiren oder Härten einverleibt wird, wobei denn die Fixir- oder Härtmittel als Beizen thätig sein würden, obwohl man sie nicht als solche hatte verwenden wollen. Dies würde also wohl auf alle oder wenigstens auf einige Färbungen zutreffen, die sich nach Fixirung mit Sublimat, Alaun, den Salzen von Eisen, Platin, Palladium, Uran und bedingungsweise auch von Chrom ergeben. Ferner kann aber die Beize nicht nur in den Fixir- oder Härtmitteln, sondern auch in den Färbmitteln selbst vorhanden sein, ohne dass man sich dessen bewusst wäre; dies gilt vielleicht vom Alaun, der ja ein Bestandtheil vieler Färbgemische ist. Auch das Jod spielt bei einigen Färbungen eine Rolle, die sich wohl nur durch die Annahme, es wirke als Beize, erklären lässt.

Bei einigen Tinktionsmethoden werden aber Beizen absichtlich angewandt, um die Farbe zu fixiren. So z. B. bei den Methoden von M. Heidenhain mit Hämateïn (§ 263) und von Rawitz mit Theerfarben (§ 333); auf beide soll in den betreffenden Kapiteln näher eingegangen und hier nur kurz der Vortheil, den sie bieten, angedeutet werden. Zuzugeben ist, dass die Beizen mitunter da gute Dienste leisten, wo ohne sie die Gewebe sich gegen die Farben rebellisch verhalten; in einigen Fällen geben sie auch ein sehr gutes Mittel zur Erzielung regressiver Färbungen an die Hand. Denn die farbigen Verbindungen, die in gebeizten Geweben fixirt werden, sind oft in einem Ueberschusse der Beize löslich, sodass letztere sehr bequem zum Entfärben dienen können.

Bei aller Anerkennung dieser Vortheile scheint mir doch gegenwärtig eine Gefahr nach der Richtung hin zu bestehen, dass die Färberei mit Beizen auszuarten droht. Denn ohne Zweifel sind die Farbstoffe von den Histologen (nicht von den Färbern) ursprünglich mit der Absicht gebraucht worden, solche Gewebselemente aufzufinden oder hervorzuheben, die eine natürliche Verwandschaft zu ihnen haben. Dieser Zweck aber wird in der am wenigsten bedenklichen Art durch substantive Färbung erzielt, denn hier kommen die natürlichen Affinitäten zwischen Gewebe und Farbstoff spontan, ungezwungen ins Spiel.

Nicht so bei der adjektiven Methode: hier wird der Farbstoff sozusagen zu einer unnatürlichen Verbindung mit allen oder wenigstens vielen Elementen des Gewebes gezwungen, worunter manche sind, die gar keine natürliche Affinität zu ihm haben. In solchen Präparaten ist die Unterscheidung zwischen den chromatischen und achromatischen Elementen verwischt, und so unterliegt die Deutung der mikroskopischen Bilder viel leichter dem Irrthum als bei der substantiven Färbung.

Hier mag noch kurz die Aufmerksamkeit auf die theoretisch interessante „inverse" Färbung gelenkt werden, die Rawitz mit seinen Beizen erzielt (§ 333). Bei diesem seltsamen Vorgang wird ein Farbstoff, z. B. Safranin, das bei substantiver Verwendung ein reiner Kernfarbstoff ist, durch die Beize zu einem reinen Plasmafarbstoff, der den Kern absolut nicht färbt. Dieser seltsame Effekt lässt sich zur Zeit kaum befriedigend erklären. Haben wir etwa anzunehmen, dass die Nucleïnsäure des Chromatins durch ihre Verbindung mit der Beize so gründlich gesättigt ist, dass sie sich nicht mehr mit dem Farbstoffe verbinden kann?

Im Allgemeinen sind folgende Substanzen vielleicht als Beizen nützlich, indem sie den Widerstand mancher Theerfarbstoffe gegen den zur Entfärbung gebrauchten Alkohol erhöhen und so eine stärkere Färbung ermöglichen:

Jod: man behandelt die Schnitte vor dem Färben einige Minuten lang mit Jodtinktur.

Kaliumhypermanganat s. die Methode von Henneguy (§ 275).

Formaldehyd: s. die Methode von Ohlmacher (§ 276.)

Anilin: s. bei Safranin (§ 278).

Chromsäure: s. die Methode von Bizzozero (§ 279).

215. Wahl der Farbstoffe. Folgende Färbgemische mögen für allgemeine Untersuchungen empfohlen werden: für Schnitte Hämalaun oder speziell nach Konservirung mit Chromosmiumgemischen Eisenhämatoxylin, Safranin oder Thionin. Will man Plasma und Kern zugleich färben, so nehme man Kernschwarz und nachher Safranin (s. § 334).

Für ganze Objekte alkoholisches Boraxkarmin, Karmalaun oder Hämalaun; es sei denn, das Objekt verlange wegen seiner Undurchlässigkeit ein stark alkoholisches Gemisch, und dann verwende man Parakarmin oder nach Fixirung mit Chromsäure Hämacalcium.

Für frische Gewebe oder kleine ganze Objekte Methylgrün. wenn die Präparate sich nicht zu halten brauchen, sonst Karmalaun oder Alaunkarmin (diese beiden geben bei Seethieren leicht Präcipitate von Gips). Zur Doppelfärbung in toto dient nach Karmin- oder Hämateïngemischen Pikrinsäure. Indessen möge der Anfänger lieber nicht gleich doppelt färben, wo eine einzige Farbe genügt.

216. Bezug der Farbstoffe. Man hat nicht leicht Erfolg beim Färben, besonders mit Theerfarbstoffen, wenn man nicht für gute Farbstoffe sorgt. Und diese lassen sich nicht mit Sicherheit dadurch erlangen, dass man sie von einer im Allgemeinen renommirten Handlung mit Chemikalien bezieht, jedenfalls nicht, wenn die Theerfarbstoffe in Frage kommen. Denn es genügt nicht, dass diese das leisten, was man im Handel von ihnen verlangt; sie mögen rein sein und brauchen doch nicht gut zu färben. Sondern sie müssen (jedenfalls gilt dies von den Theerfarbstoffen) identisch mit denen sein, die der Autor benutzt hat, der sie empfiehlt und über ihre Wirkung berichtet (so z. B. Safranin, s. § 278). Daher erachte ich es für nöthig, Jedermann den Bezug seiner Reagentien — wenigstens der Theerfarbstoffe — von den wohlbekannten Chemikern Grübler & Hollborn in Leipzig oder G. Münder in Göttingen anzurathen. Grübler hat sie alle vorräthig und liefert nur solche, von denen er sicher weiss, dass sie in der gewünschten Weise färben. Er bereitet ferner die Fixir- und Färbgemische, Injektions- und Einbettmassen etc. nach den bewährten Formeln und versendet sie gebrauchfertig. Aus eigener Erfahrung kann ich seine Präparate nur warm empfehlen,[1]) denn in 9 unter 10 Fällen sind sie besser, als man sie sich selber machen wird.

[1]) Dies thue auch ich und erkenne bei dieser Gelegenheit gern die Bereitwilligkeit der Firma Grübler & Hollborn an, die oft recht speziellen Fragen und Wünsche der Forscher sorgfältig zu erledigen. Ueber Münder habe ich keine eigenen Erfahrungen. [M.]

11. Kapitel.

Färben mit Karmin und Cochenille.

217. Theoretisches über das Färben mit Karmin. Nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1892 p. 480) hat man früher irrige Vorstellungen über das Färben mit Karmin gehegt, da man glaubte, Karmin sei Karminsäure mit einigen Verunreinigungen. Indessen ist das unrichtig, denn nach Liebermann (Ber. D. Chem. Ges. 18. Jahrg. 1886 p. 1969) ist Karmin eine Verbindung von Karminsäure mit Thonerde, Kalk und Eiweisskörpern, eine echte chemische Verbindung, worin Thonerde und Kalk ebenso wenig fehlen dürfen, wie das Natrium im Kochsalz. Ein sehr gutes Karmin enthielt etwa 17 % Wasser, 20 % stickstoffhaltige Substanzen, 56 % Karminsäure, reichlich je 3 % Thonerde und Kalk, ein wenig Magnesia, Kali, Natron, Phosphorsäure, endlich eine Spur Wachs. Mayer kommt zum Schlusse, dass beim histologischen Färben (nicht beim technischen) ausser der Karminsäure stets die Thonerde, manchmal auch der Kalk eine Rolle spielen. Die anderen Basen haben diese Bedeutung nicht, und die Proteïnsubstanzen sind, soweit sie überhaupt einen Einfluss ausüben, wohl eher schädlich, da sie zu der wohlbekannten Fäulniss der Lösungen Veranlassung geben.

Auf Grund dieser Ergebnisse war es nur logisch, wenn man statt des Karmins die Karminsäure zum Ausgangspunkt für die Färblösungen nahm. Dies hatte schon Dimmock (Amer. Natural. Vol. 18 1884 p. 324) gethan, indessen ohne Erfolg, da sich in seinen Gemischen der zweite wichtige Faktor, die Thonerde, nicht vertreten fand; er färbte entweder nur mit reiner Karminsäure oder deren Ammoniaksalz und erhielt daher nur schwache und diffuse Färbungen. Mayer hingegen suchte nach geeigneten Mitteln zur Einführung der Thonerde in die Lösungen; seine Resultate siehe im folgenden §.

218. Die Karminsäure ist chemisch rein, wie sie erst vor Kurzem von Schunck & Marchlewski kristallisirt dargestellt worden ist, im Handel noch nicht zu haben, dürfte auch für praktische Zwecke zu theuer sein. Wie man sie gewöhnlich erhält, ist sie amorph, rothbraun, in Wasser und schwächeren Alkoholen leicht löslich; sie darf nicht hygroskopisch sein und beim Glühen auf dem Platinblech keine Asche hinterlassen. Es ist eine zweibasische Säure, die aus Marmor die Kohlensäure austreibt und mit den Alkalimetallen lösliche, mit den Erd- und Schwermetallen hingegen unlösliche Verbindungen liefert, über die noch wenig Genaues bekannt ist. Das Thonerdesalz, das Aluminiumkarminat, hat die bemerkenswerthe Eigenschaft, nicht nur in Säuren und sauren Salzen, sondern auch in Alkalien und basischen Salzen, wie Borax, löslich zu sein, falls man als Flüssigkeit nur Wasser oder schwachen Alkohol nimmt. Man erhält es durch Fällen einer Lösung von Karminsäure oder Ammoniumkarminat durch Aluminiumacetat, ferner, aber nur theilweise, durch Chloraluminium, nicht aber durch Alaun, da sich das entstehende Aluminiumkarminat sofort wieder auflöst, sodass die zum Färben geeignete Lösung, das **Karmalaun** (§ 223), zu Stande kommt.

Fällt man die Karminsäure, wie eben erwähnt, mit Chloraluminium aus, setzt aber dann vorsichtig mehr von letzterem hinzu, so löst sich der Niederschlag wieder auf, und es resultirt eine Lösung, die man zum Färben nehmen mag, wenn man Alaun aus irgend einem Grunde zu vermeiden wünscht. Genaueres s. im § 224. Diese und das Karmalaun färben übrigens violett, etwa wie Alaunkarmin. Setzt man jedoch Chlorcalcium zum Karmalaun, so wird sofort der Ton der gefärbten Objekte lebhafter roth; nur bildet sich zugleich durch Umsetzung Calciumsulfat, das unlöslich ist. Daher ist es richtiger, man fügt das Chlorcalcium zu dem Chloraluminium; in der That erhält man ein gutes Gemisch, wenn man alle Ingredienzien in Alkohol löst. Dies ist das **Parakarmin** (§ 239).

Vergleicht man die obigen Auseinandersetzungen über das Färben mit Karminsäure mit denen über das Färben mit Hämatoxylin, wie sie im nächsten Kapitel gegeben werden sollen, so findet man eine interessante Parallele: in beiden Prozessen ist nicht der Farbstoff an sich thätig, sondern in Verbindung mit Thonerde; die Farbe resultirt in dem einen Falle aus Karminsäure + Thonerde, in dem anderen aus Hämateïn + Thonerde, während andere Substanzen, z. B. Kalk, nur gelegentlich dabei eine Rolle spielen.

219. Färben mit Cochenille. Nach Mayer, dessen frühere Untersuchungen durch seine neuesten (Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1892 p. 496) bestätigt werden, ist in dem Auszug aus Cochenille, wie er histologisch verwandt wird, keine freie Karminsäure, sondern ein karminsaures Alkali vorhanden; der wässerige Auszug enthält Spuren von Kalk, der alkoholische gar keinen. Der wässerige Auszug mit Alaun (Alauncochenille, § 226) verdankt seine Färbkraft dem Aluminiumkarminat (s. oben § 218). Der Auszug mit Alkohol allein enthält dagegen nur das karminsaure Alkali und färbt daher nur schwach und diffus, wie die Karminsäure selbst. Trifft er aber in den Geweben mit Salzen von Kalk, Magnesia, Thonerde oder Metallen zusammen, die damit gefärbte Niederschläge bilden, so kann daraus eine starke und elektive Färbung resultiren. In der That giebt Mayers einfache Cochenilletinktur (§ 241) mit Objekten, die solche Salze enthalten, sehr schöne Erfolge. Leider sind aber derartige Objekte ziemlich selten, und daher liefert die Cochenilletinktur meist sehr schwache Färbungen. Setzt man dagegen zur Tinktur von vorne herein die nöthigen Salze, so muss sie ohne Weiteres bei jeder Art von Objekten eine starke elektive Färbung ergeben; dies ist denn auch der Fall (§ 242).

220. Allgemeine Bemerkungen. Was lässt sich mit den Karmingemischen am besten färben? Etwa frische Gewebe? Mit Ausnahme des Essigsäurekarmins, nein! Oder Schnitte? Abermals nein, denn in 9 von 10 Fällen färbt man sie mit Theerfarbstoffen oder mit Hämateïngemischen besser als mit Karmingemischen. Oder ganze Thiere und Stücke von Thieren? Ja, denn in vielen, wenn nicht gar in den meisten Fällen eignet sich hierzu ein Karmingemisch besser als die anderen Farbstoffe. Die meisten Hämateïngemische nämlich überfärben gar zu gern, und die Theerfarbstoffe eignen sich fast ausnahmslos gar nicht dazu.

Ueberfärbungen lassen sich stets mit schwacher Salzsäure (etwa $^1/_{10}$ $^0/_0$) auswaschen. Nach Henneguy (Journ. Anat. Phys. Paris 27. Année 1891 p. 400) soll dazu Kaliumhypermanganat brauchbar sein, aber dies dürfte eher die Färbung ganz und gar vernichten, als sie differenziren. Alle Arten von Karminfärbung halten sich in Balsam, nur die mit Essigsäurekarmin nicht. Man darf aber keins von den sauren Gemischen oder den Grenacherschen Lösungen verwenden, falls die

Gewebe kalkige Elemente enthalten, die man unversehrt lassen möchte, es sei denn, man wendete es ganz verdünnt an.

221. Wahl eines Karmingemisches. Dem Anfänger sei vor Allem das alkoholische Boraxkarmin (§ 237) empfohlen, da dieses am leichtesten zu behandeln ist. Die Methoden von Mayer zeichnen sich durch viel grössere Einfachheit und Genauigkeit aus und werden daher vielleicht mit der Zeit entweder selbst oder doch, indem andere Methoden nach Mayers Prinzipien ausgedacht werden, die älteren ersetzen. Darum werden aber einige von den älteren Färblösungen doch ihren Platz behaupten. Alaunkarmin ist und bleibt ein prachtvolles Mittel, und Boraxkarmin übertrifft das Parakarmin (wie Mayer selbst anerkennt) an Stärke und Glanz der Färbung, jedoch wird die grössere Präzision der Methoden von Mayer zweifellos Anerkennung finden. Und so darf man denn auch hoffen, dass in Zukunft nicht mehr so gar viele Formeln von der früheren Art, die auf gut Glück mit Karmin oder Hämatoxylin als dem Hauptbestandtheil hantirten, publizirt werden.

Auf Grund meiner Ueberzeugung davon, das Mayers Anschauungen über das Färben mit Karmin richtig sind, habe ich sehr viele Formeln weggelassen, die sowohl in der Praxis überflüssig als auch in der Theorie irrationell sind. S. hierüber die früheren englischen Auflagen dieses Buches.

222. Reine Karminsäure ist gegenwärtig am besten von Grübler & Hollborn in Leipzig (Bayerische Strasse 63) zu erhalten. Ihr Preis beträgt etwa 3 M. für 10 g. Aus anderen Quellen bezogene enthielt, wie mir Mayer mitgetheilt hat, entweder nicht unbeträchtliche Beimischungen von anorganischen Bestandtheilen oder war hygroskopisch und deswegen schlecht zu verwenden oder endlich war zu theuer.

A. Wässerige Gemische.

a) Saure.

223. Karmalaun nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1891 p. 489). Karminsäure 1 g und Alaun 10 g löse man warm (oder auch bei gewöhnlicher Temperatur) in 200 ccm destillirtem Wasser, lasse absetzen und giesse ab oder filtrire, setze auch ein Antiseptikum zu, also einige Thymolkristalle oder $^1/_{10}$ % Salicylsäure oder $^1/_2$ % Natriumsalicylat. Die Lösung ist haltbar; sie ist roth mit einem Stich ins Violette und färbt selbst die mit Osmium konservirten Objekte durch. Wäscht man hinterher bloss mit Wasser aus, so behält das Plasma etwas Farbe zurück; will man also eine ganz reine Kern-

färbung haben, so nehme man zum Auswaschen Alaunlösung (und dann muss man diese später wieder mit Wasser fortschaffen) oder in hartnäckigen Fällen eine schwache Säure. Der allgemeine Effekt ist der einer Färbung mit Alaunkarmin (§ 225); jedoch färbt letzteres im Allgemeinen nicht gut durch (s. hierüber § 227), Karmalaun hingegen wohl.

Eine Lösung, die dem Alaunkarmin von Grenacher nahe kommt und nur etwas rother färbt, erhält man aus 1 Theil Karminsäure, 30—50 Alaun und 1000 Wasser (ebenfalls mit einem Antiseptikum).

Die Objekte, die mit Karmalaun (gewöhnlichem oder schwachem) gefärbt werden sollen, dürfen nicht alkalisch reagiren.

224. Karminsäure und Aluminiumchlorid nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1892 p. 490). In 200 g destill. Wasser löse man 1 g Karminsäure und 3 g Aluminiumchlorid und setze wie beim Karmalaun ein Antiseptikum hinzu (§ 223). Verwendung wie Karmalaun; färbt blauviolett, sehr stark und elektiv, aber nicht so exklusiv die Kerne wie jenes. Zu empfehlen nur, falls aus irgend einem Grunde das Karmalaun des Alauns wegen nicht zu gebrauchen ist.

225. Alaunkarmin nach Grenacher (Arch. Mikr. Anat. 16. Bd. 1879 p. 465). Eine wässerige Lösung von 1—5 % (oder auch von beliebiger anderer Stärke) Kali- oder Ammoniakalaun wird 10—20 Minuten lang mit 1/2—1 % Karmin gekocht. (Es ist vielleicht besser, man kocht mit einer sehr starken Lösung und verdünnt sie erst später bis zur gewünschten Stärke.) Nach dem Erkalten filtrire man.

Das Alaunkarmin darf nicht verwandt werden, falls in den Geweben kalkige Elemente sind, die man nicht zerstört wissen möchte.

Nach Mayer (Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 29) färbt das Alaunkarmin stärker und mehr nach Roth hin, wenn man 2 g Karmin mit 5 g Alaun und 100 ccm Wasser 1 Stunde lang kocht; es ist dann ziemlich stark sauer geworden, indem der Alaun etwas Schwefelsäure abgegeben hat, die aus dem Karmin Karminsäure frei macht. Man erreicht also dasselbe, wenn man dem Alaunkarmin (oder dem Karmalaun) etwas Karminsäure zusetzt.

Tizzoni (Bull. Sc. Med. Bologna 1884 p. 259), Pisenti (Gazz. Osped. Milano 1885 No. 24; Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 378) und Grieb (Mem. Soc. Ital. Sc. Tome 6 1887 No. 9; Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 47) haben Modifikationen der Grenacherschen Formel veröffentlicht, die mir nicht rationell erscheinen.

Das Alaunkarmin ist neben den Theerfarbstoffen eins der besten Färbmittel. Es sei dem Anfänger besonders seiner bequemen Anwendung halber empfohlen: man kann kaum damit überfärben (ausgenommen Muskeln). Jedoch dringt es nicht leicht in die Tiefe und eignet sich daher gar nicht zum Durchfärben grosser Stücke. Man kann diesem

Uebel allerdings einigermaassen durch Henneguys Mittel abhelfen (§ 227), falls man nicht gleich zum Karmalaun greifen will.

Die Farbe hält sich in Balsam und soll es auch in wässerigen Flüssigkeiten thun, die nicht sauer reagiren.

226. Alauncochenille nach Partsch (Arch. Mikr. Anat. 14. Bd. 1877 p. 180). In einer 5 %igen Lösung von Alaun koche man längere Zeit fein geriebene Cochenille, filtrire und gebe als Antiseptikum etwas Salicylsäure hinzu.

Czokor (Arch. Mikr. Anat. 18. Bd. 1880 p. 413) giebt eine ähnliche Vorschrift: Cochenille und Alumen ustum je 7 g, Wasser 700 ccm, einzukochen auf 400 cm. Nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1892 p. 496) enthält aber die Lösung nicht genug Alaun, während die von Partsch rationell ist; letztere hält sich auch besser. Mayer empfiehlt übrigens, um die Cochenille gründlicher auszuziehen, ausser den 5 % Alaun 1 % Kaliumnitrat zu nehmen.

Rabl (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 168) rühmt die Alauncochenille sehr, da sie kein spezifisches Kernfärbmittel sei; seine eigene Vorschrift ist: je 25 g Alaun und Cochenille, 800 ccm Wasser einzukochen auf 600.

Alle diese Vorschriften geben Gemische, die dem Alaunkarmin ganz nahe kommen, jedoch vielleicht noch feinere Abstufungen in den Farbtönen, welche die einzelnen Gewebe annehmen, liefern; indessen hängt das so sehr von der Qualität des Karmins und der Cochenille sowie von der Art der Gewebe selber ab, dass sich keine allgemeine Regel geben lässt. Jedenfalls ist die Alauncochenille genau so anzuwenden wie das Alaunkarmin.

227. Alaunkarmin mit Essigsäure. Henneguy (Lee & Henneguy, Traité 1. Ed. 1887 p. 88) kocht Karmin in einer konzentrirten Lösung von Kalialaun in Wasser, fügt nach dem Erkalten 10 % Eisessig hinzu, lässt einige Tage absetzen und filtrirt dann. Zum Färben giebt er nur so viel von dem Gemisch zu destillirtem Wasser, dass dieses tief rosa wird, bringt der raschen Diffusion halber die Objekte direkt aus Alkohol hinein, lässt sie 1—2 Tage darin und wäscht sie 1—2 Stunden in destill. Wasser aus. In Glycerin halten sich die Präparate nicht so gut wie in Balsam.

Dieses Alaunkarmin dringt tiefer ein als das gewöhnliche und färbt in der Tiefe ebenso gut wie oberflächlich. Die Farbe ist ein etwas unschönes Violett, wird aber rother, wenn man die Objekte wie beim Boraxkarmin (§ 237) mit schwacher Salzsäure behandelt.

228. Alaunkarmin und Pikrinsäure. Die mit Alaunkarmin tingirten Objekte kann man mit Pikrinsäure nachfärben. Legal (Morph. Jahrb. 8. Bd. 1883 p. 356) erreicht dies in sehr zweckmässiger Weise, indem er ein Gemisch von 10 Vol. Alaunkarmin mit 1 Vol. gesättigter wässeriger Pikrinsäurelösung zum Färben benutzt.

229. Essigsäurekarmin nach Schneider (Z. Anzeiger 3. Jahrg. 1880 p. 254). Man löst in kochender Essigsäure von 45% Karmin bis zur Sättigung auf und filtrirt. (In dieser Stärke löst die Säure nach Schneider am meisten Karmin.) Die Lösung verdünnt man entweder auf 1% und benutzt sie dann zum langsamen Färben, oder man giebt sie direkt zu dem lebenden Objekt unter dem Deckglase; alsdann fixirt und färbt sie zugleich. Sie dringt sehr leicht ein und giebt eine reine Kernfärbung, die aber nicht haltbar ist. Deshalb und auch aus anderen Gründen ist ihre Anwendung sehr beschränkt.

Pianese (Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1894 p. 502) macht in ähnlicher Weise ein Ameisensäurekarmin. Wahrscheinlich giebt in allen Fällen, wo man Essigsäurekarmin braucht, Methylgrün bessere Resultate.

230. Eisenkarminat nach Zacharias (Z. Anzeiger 17. Jahrg. 1894 p. 62). Zacharias färbt die Objekte ordentlich in einem Essigsäurekarmin, dessen Vorschrift ich nicht erst lange gebe, weil, wie mir P. Mayer mitgetheilt hat und ich bestätigen kann, Karmalaun hierzu ebenso gut ist. Dann werden sie mit schwacher Essigsäure abgespült und in eine 1% Lösung von citronensaurem Eisenoxyd-Ammonium gebracht (metallene Spatel etc. sind hierzu nicht zu brauchen, wenn man mit dem Essigsäurekarmin gefärbt hat). Darin bleiben sie, bis sie gut durchtränkt sind, etwa 2—3 Stunden (Schnitte nur wenige Minuten), aber nicht länger, da sie sonst zu schwarz werden. Man wäscht sie dann tüchtig in destillirtem Wasser aus und bringt sie durch Alkohol etc. in Balsam. Gefärbt ist Alles, nach Zacharias graublau, in meinen Präparaten das Chromatin blau, das Plasma braun; unter Anderem treten die Spindeln und ihre Reste recht gut hervor. Mitunter mag die Methode also nützlich sein.

Nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1892 p. 488) beruht obige Färbung darauf, dass das Aluminiumkarminat des Karmins nachträglich in Eisenkarminat umgewandelt wird.

b) Basische und sogenannte neutrale.

231. Magnesiakarmin nach Mayer (Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 23). Da die Lösungen des Karmins in wässerigem Ammoniak fortwährend Ammoniak verlieren, und die sonst gebräuchlichen (Natron- oder Lithionkarmin) meist zu stark alkalisch sind, so verwendet Mayer als Basis zum Lösen des Karmins die gebrannte Magnesia und gewinnt so Lösungen, die nicht nur konstant bleiben, sondern auch während der Zeit, die zum Färben erforderlich ist, die Gewebe nicht so stark schädigen (also z. B. die mit Eiweiss aufgeklebten Schnitte nicht loslösen), wie es sonst meist der Fall ist. Das starke Magnesiakarmin („Stammlösung“) erhält man, indem man 1 g Karmin und 0,1 g Magnesia usta mit 50 ccm destillirtem Wasser 5 Minuten lang kocht, filtrirt und

mit 3 Tropfen Formol versetzt. Hält sich viele Monate lang vollkommen klar. Beim Kochen löst sich nicht alles Karmin, aber ein Zusatz von Magnesia bessert das nicht, sondern schlägt nur schon gelöstes nieder; gelöst werden reichlich $1\frac{1}{2}\%$ Karmin. Zur Bereitung des schwachen Magnesiakarmins löst man 0,1 g Karmin durch halbstündiges Kochen in 50 ccm Magnesiawasser, filtrirt und setzt ebenfalls Formol zu. (Das Magnesiawasser gewinnt man, indem man 0,1 g Magnesia usta mit 100 ccm Brunnenwasser eine Woche lang unter öfterem Umschütteln in Berührung lässt und beim Gebrauch klar abzieht; es bleibt nur dann alkalisch genug, wenn es auf der ungelösten Magnesia steht.)

Beide Magnesiakarmine sind sowohl für Schnitte als auch für Objekte in toto zu gebrauchen; das starke färbt aber nicht erheblich stärker als das schwache. Nach dem Färben wäscht man mit Wasser gut aus. Am besten verwendet man übrigens das Magnesiakarmin mit einem Zusatz von Magnesiumpikrat (§ 233).

232. Pikrokarmin. Unter Pikrokarmin versteht man gewöhnlich Lösungen, worin Pikrinsäure, Ammoniak (oder Natron oder Lithion), Kohlensäure (auch wohl Essigsäure) und Karmin in willkürlichen Verhältnissen vorkommen. Ranvier, der Erfinder des Pikrokarmins, glaubt zwar, nach seiner Methode bereitet, sei es ein Doppelsalz von Pikrinsäure und Karminsäure mit Ammoniak, also Ammoniumpikrokarminat. Davon kann aber schon deswegen keine Rede sein, weil Karmin keine Karminsäure ist, sondern auch Thonerde und Kalk enthält (s. oben p. 135). Vielmehr ist nach Mayer (Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 18 ff.) das gewöhnliche Pikrokarmin ein durchaus inkonstantes Gemisch von Ammoniumpikrat, Ammoniakkarmin und freiem Ammoniak und wirkt daher oft auf die Gewebe schädlich ein. Enthält es nur wenig freies Ammoniak und auch genug Ammoniakkarmin, so ergiebt es mitunter gute Doppelfärbungen (roth und gelb), indessen können diese ebenso gut oder wohl noch besser durch Vorfärben mit Boraxkarmin oder Parakarmin und Nachfärben mit Pikrinsäure erzielt werden.

Von den **älteren Vorschriften** mögen hier folgende erwähnt werden. Die von Ranvier (Traité techn. 1. Ed. p. 100) ist ungenau; auch die aus seinem Laboratorium stammende, in Lee & Henneguy, Traité 2. Ed. 1896 p. 86 abgedruckte ergiebt kein konstantes Präparat. Fernere Formeln publizirten Gage (Amer. Month. Micr. Journ. 1. Vol. 1880 p. 22; Journ. R. Micr. Soc. London Vol. 3 1880 p. 501); Fol (Lehrbuch p. 195); Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. 1880 p. 20); Baber (Month. Micr. Journ. Vol. 12 p. 48); Pergens (Carnoy, Biol. cellulaire p. 92); Hoyer (Biol. Centralbl. 2. Bd. 1882 p. 19); Bizzozero (Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 539); Klemensiewicz (Sitz. Ber. Akad. Wien 78. Bd. 1878 3. Abth. p. 35; Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 501); Cuccati (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 42); Poljakoff (Arch. Mikr. Anat. 45. Bd. 1895 p. 574). Natronpikrokarmin

bereitet Löwenthal (Anat. Anzeiger 2. Jahrg. 1887 p. 22 und Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 313). Weigert (Arch. Path. Anat. 84. Bd. 1881 p. 283) stumpft das überschüssige Ammoniak nicht mit Pikrinsäure, sondern mit Essigsäure ab. Orth (Berlin. Klin. Wochenschr. 28. Jahrg. 1883 p. 421) giebt ein Lithionpikrokarmin an, das aber gleich dem Lithionkarmin selber (§ 234) stark macerirt.

233. Pikromagnesiakarmin nach Mayer (Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 25). Zur Herstellung dient ausser dem Magnesiakarmin (§ 231) eine Lösung von Magnesiumpikrat, die man entweder durch Erhitzen von 200 ccm einer 1/2 %igen wässerigen Lösung von Pikrinsäure mit 0,25 g Magnesiumkarbonat, Absetzenlassen und Filtriren, oder durch Lösen von 0,6 g festem Salz (bei Grübler & Hollborn zu haben) in 100 ccm destill. Wasser erhält. Und zwar gebe man zu 10 Voll. dieser Lösung 1 Vol. des starken Magnesiakarmins, oder man mische gleiche Theile der Lösung und des schwachen Magnesiakarmins mit einander. Gegen Schimmelpilze setze man etwas Formol zu.

Beide Arten Pikromagnesiakarmin enthalten höchstens 1 1/2 promille Karmin, färben aber nach Mayer Schnitte meist schon in einigen Minuten und eignen sich auch zum Durchfärben von Stücken, wirken überhaupt rascher und stärker als die gewöhnlichen Pikrokarmine, die meist viel mehr Karmin enthalten sollen.

Mayer räth übrigens im Allgemeinen vom Gebrauch jeglicher Art von Pikrokarmin, also auch dieses neuesten, durchaus ab und möchte es höchstens für ganz spezielle Zwecke reservirt wissen.

234. Lithionkarmin nach Orth (Berlin. Klin. Wochenschr. 28. Jahrg. 1883 p. 421). Ueberflüssig, macerirt stark (P. Mayer).

235. Ammoniakkarmin (s. auch § 236). Ist eigentlich heutzutage nicht mehr nöthig, will man es jedoch benutzen, was in der That noch häufig beim Studium des Centralnervensystems geschieht, so sollte man wenigstens für die Entfernung des freien Ammoniaks so viel wie nur möglich sorgen, indem man die Lösung kocht. Am besten aber bereitet man es nach Ranvier (briefliche Mittheilung von Malassez, s. Lee & Henneguy, Traité 1. Ed. p. 82), indem man einfach Karmin in Wasser mit nur geringem Ueberschuss an Ammoniak löst und es dann in einer tiefen Schale der Verdunstung überlässt; wenn es dabei faulen will, um so besser. Das trockene Pulver löst man in Wasser auf und filtrirt.

c) Andere wässerige.

236. Saures Ammoniakkarmin nach Schweigger-Seidel (Ranvier, Traité, 1. Ed. p. 99; Frey, Mikroskop 6. Aufl. 1877 p. 96). Ammoniakkarmin nach Beale (Frey, Mikroskop 6. Aufl. 1877 p. 95); nach Frey (ibid. p. 94: beide enthalten Glycerin und Alkohol); nach Hoyer (Biol. Centralbl. 2. Bd. 1882 p. 17);

nach Hamann (Internation. Monatschr. Anat. Hist. 1. Bd. 1884 p. 346; Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 87); Neutrales Boraxkarmin nach Nikiforow (Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 337); nach Grenacher (Arch. Mikr. Anat. 16. Bd. 1879 p. 466): nach Haug (Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 151; 8. Bd. 1891 p. 52). Boraxkarmin nach Woodward (Month. Micr. Journ. Vol. 7 1872 p. 38; Journ. R. Micr. Soc. London Vol. 2 1879 p. 613); nach Gibbes (Journ. R. Micr. Soc. London (2) Vol. 3 1883 p. 390). Osmiumkarmin nach Delage (Arch. Z. Expér. (2) Tome 4 1886 p. 121; Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 240). Lösliches Karmin nach Perl (Frey, Mikroskop 7. Aufl.; Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 91). Borsäurekarmin nach Arcangeli (Proc. Verb. Soc. Toscana Sc. N. 1885 p. 283; Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 377). Alaunkarmin mit Borsäure oder mit Salicylsäure nach Arcangeli (ibid.). Salicylsäurekarmin nach Arcangeli (ibid.). Pikrinsäurekarmin nach Arcangeli (ibid.); nach Minot (Whitman, Methods p. 42). Urankarmin nach Gierke (Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 92): nach Schmaus (Münchener Med. Wochenschr. 1891 p. 147; Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 230). Sodakarmin nach Cuccati (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 50).

B. Alkoholische Gemische.

237. Alkoholisches Boraxkarmin nach Grenacher (Arch. Mikr. Anat. 16. Bd. 1879 p. 466). In einer 4 %igen wässerigen Lösung von Borax löst man durch Kochen 2—3 % Karmin auf, setzt das gleiche Volumen Alkohol von 70 % hinzu und filtrirt nach längerem Stehen. Die Objekte lässt man in der Lösung, bis sie gut damit durchtränkt sind, eventuell Tage lang, und bringt sie dann, ohne sie auszuwaschen, in Alkohol von 70 %, der mit Salzsäure (4—6 Tropfen auf 100 ccm) angesäuert ist. Hierin bleiben sie, bis die Farbe sich aus dem Plasma auf die Kerne zurückgezogen hat, was ebenfalls Tage lang dauern kann; sie sehen dann hellroth, durchsichtig aus und kommen nun in neutralen Alkohol.

Das Boraxkarmin ist vielleicht von den Mitteln zum Durchfärben das gebräuchlichste. Es lässt sich leicht handhaben und giebt eine sehr schöne Färbung. Indessen dringt es nicht so gut durch, wie man gemeiniglich glaubt, und bildet auch zuweilen im Innern dicker Stücke Präcipitate, die sich auch im sauren Alkohol nicht wieder lösen. Ferner reagirt es alkalisch und eignet sich daher für Zellenstudien nicht; es scheint mir auch, als habe man ihm zu grosses Zutrauen geschenkt, und so wird man wohl eine oder die andere sonst vorzügliche Arbeit auf diesem Gebiete wieder aufnehmen müssen.

Das Boraxkarmin ist schon 1865 von Thiersch (Arch. Mikr. Anat. 1. Bd. 1865 p. 149) und ähnlich auch von Woodward (Month. Micr. Journ. Vol. 7 1872

p. 38) angewandt worden, jedoch sind beide Vorschriften wenig rationell, scheinen auch kaum richtig in Aufnahme gekommen zu sein, sodass erst Grenacher mit seiner Formel durchdrang.

238. Boraxkarmin nach Mayer (Whitman, Methods p. 40). Für zarte Objekte wird besser ein Boraxkarmin mit stärkerem Alkohol gebraucht, etwa von 50—70%. Kochender Alkohol von 50—60% löst allerdings nur etwa 1% Borax und ebenso viel Karmin, der von 70% noch nicht 1/4% Borax, und das Boraxkarmin mit 70%igem Alkohol sieht ganz hell aus, aber das ist für kleine Objekte gerade vortheilhaft.

239. Parakarmin nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1892 p. 491). Karminsäure 1 g, Chloraluminium 1/2 g und Chlorcalcium 4 g werden in 100 ccm 70%igem Alkohol warm oder kalt gelöst; nach dem Absetzenlassen wird filtrirt. Hellroth, besonders gut zum Durchfärben, kommt einigermaassen dem Grenacherschen Boraxkarmin nahe. Die Objekte dürfen nicht alkalisch reagiren oder viel Kalk (Spicula, Skelette) enthalten, der zu Niederschlägen Veranlassung geben würde. In der Regel färbt sich das Plasma etwas mit, aber das ist für Objekte, die geschnitten werden sollen, oder für Schnitte meist vortheilhaft, also wäscht man einfach mit Alkohol von 70% aus. Sollen aber die Objekte ganz in Balsam kommen, oder braucht man eine präzise Kernfärbung, so setzt man zum Waschalkohol ein wenig Chloraluminium oder etwa 5% Essigsäure von 50% (2 1/2% Eisessig). Färbt man grosse Thiere mit umfangreichen Höhlungen, z. B. Salpen, so verdünnt man am besten das Parakarmin stark mit 70%igem Alkohol, säuert es aber ein wenig an, da sonst leicht etwas Farbe ausfällt, besonders wenn die Objekte nicht ganz gut konservirt sind. Das Parakarmin giebt freilich keine so feurig rothen Tinktionen wie das Boraxkarmin, ist aber den Geweben weniger schädlich, dringt auch wegen seines stärkeren Alkohols besser durch, bildet in den Objekten nicht so leicht Niederschläge und hält sich im Allgemeinen Jahre lang völlig klar.[1]) Das meinige hat ein wenig abgesetzt.

240. Salzsäurekarmin. Unter Umständen mag ein nicht alkoholisches Karmingemisch mit noch stärkerem Alkohol, als das Parakarmin, von Vortheil sein, namentlich bei schwer durchdringlichen Objekten. Die älteste Vorschrift dazu, die von Grenacher (Arch. Mikr. Anat. 16. Bd. 1879 p. 468) ist nicht leicht zu befolgen und auch nicht präzis genug. Mayer hat sie etwas genauer formulirt und vereinfacht (Mitth. Z. Stat. Neapel 4. Bd. 1883 p. 521; Internation.

[1]) Meine ältesten Lösungen sind noch genau so klar wie zu Anfang. Indessen wird das von der Güte der Karminsäure abhangen, die sich ja klar in Alkohol lösen soll. [M.]

Monatschr. Anat. Phys. 4. Bd. 1887 p. 43): 4 g Karmin werden in 15 ccm Wasser und 30 Tropfen Salzsäure durch Kochen gelöst; dann fügt man 95 ccm Alkohol von 85 % hinzu, filtrirt heiss, neutralisirt mit Ammoniak, bis ein bleibender Niederschlag gerade entstehen will, und filtrirt nach dem Erkalten eventuell nochmals. Zum Auswaschen der Objekte dient Alkohol von 80—90 %, und wenn man reine Kernfärbung haben will, so muss er mit Salzsäure versetzt sein; auch die Lösung darf man nur mit starkem Alkohol verdünnen.

241. Cochenilletinktur nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. 1880 p. 14). Pulverisirte Cochenille lässt man mehrere Tage lang mit dem 8—10fachen an Alkohol von 70 % in der Kälte in Berührung, schüttelt sie öfter um und filtrirt die klare Tinktur ab.[1])

Die Objekte bringt man vorher in Alkohol von 70 % und wäscht nachher die überflüssige Farbe mit ebenso starkem Alkohol wieder ganz sorgfältig aus (zum Verdünnen der Tinktur muss gleichfalls Alkohol von 70 % genommen werden). Warmer Alkohol wäscht rascher aus als kalter. Ueberfärbung kommt selten vor und lässt sich leicht durch etwas sauren Alkohol (mit $^1/_{10}$ % Salzsäure oder 1 % Essigsäure) korrigiren. Kleine Objekte sowie Schnitte färben sich in einigen Minuten durch, grosse brauchen Stunden oder gar Tage. Die Farbe geht fast ausschliesslich an die Kerne; sie wechselt je nach der Reaktion der Gewebe und der An- oder Abwesenheit gewisser Salze darin. Crustaceen mit dickem Chitin werden in der Regel roth, die meisten anderen Thiere blau. Oft zeigen sich auch in demselben Objekte die Gewebe verschieden gefärbt: so werden Drüsen oder ihr Sekret oft grau-grün; in Embryonen von *Lumbricus* fand Kleinenberg die Blutgefässe roth, ihren Inhalt aber intensiv blau gefärbt. Säuren ändern die Farbe nach gelblich roth hin, kaustische Alkalien in ein tiefes Purpurn.

Die besten Färbungen liefern Objekte, die mit Chrom- oder Pikringemischen oder mit Alkohol konservirt sind; aus denen mit Osmium hat man letzteres vorher durch Bleichen (§ 568) wegzuschaffen. Auch die Säuren müssen gut ausgewaschen worden sein, sonst wird die Färbung diffus. In Nelkenöl oder Balsam ist sie haltbar.

In Folge ihres leichten Eindringens in die Tiefe ist die Cochenilletinktur besonders da werthvoll, wo chitinige Membranen den wässerigen Karmingemischen grosse Hindernisse in den Weg legen würden.

---

[1]) Enthält das Filtrirpapier viel Kalk, so fallen schon bald nachher Flocken von Calciumkarminat aus. [M.]

Erst nach längerer Anwendung habe ich die Cochenilletinktur schätzen lernen und glaube nun, sie ist noch nicht bekannt genug. Sehr nützlich ist sie z. B. für Anneliden und unentbehrlich für Arthropoden. Auf der anderen Seite färbt sie aber die ungeeigneten Objekte nur kümmerlich, und dahin gehören allerdings die meisten, mit denen der Histologe zu thun hat. Daher hat Mayer seine neue Tinktur (s. den folgenden §) erdacht, die bereits in sich die nöthigen Salze zur Hervorbringung einer sehr elektiven Färbung enthält, mithin auf alle Objekte passt. Es sieht auch fast so aus, als wolle er die neue den Platz der alten einnehmen lassen, indessen glaube ich, ist diese doch noch nicht abzuschaffen: ist sie doch stärker alkoholisch als die neue (und dies ist manchmal wichtig), enthält ferner keine freie Säure, kann also auch für Objekte mit Kalkeinlagerungen (Nadeln etc.), die nicht zerstört werden dürfen, angewandt werden, was mit der neuen nicht geht. So finde ich sie z. B. für die Pluteuslarven ausgezeichnet.

242. Neue Cochenilletinktur nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1892 p. 498). Cochenille 5 g, Chlorcalcium 5 g, Chloraluminium 1/2 g, Salpetersäure (von 1,20 spez. Gew.) 8 Tropfen, Alkohol (von 50 %) 100 ccm. Die fein pulverisirte Cochenille wird in einem Mörser mit den Salzen gut gemischt, mit dem Alkohol und der Säure versetzt, das Ganze bis zum Kochen erhitzt, einige Tage unter häufigem Umschütteln kalt stehen gelassen und filtrirt.

Anwendung wie bei der alten Tinktur, nur wird stets Alkohol von 50 % statt des 70 %igen genommen. Die Färbung ist ähnlich der mit Parakarmin, nur nicht ganz so stark und präzis. Mayer empfiehlt sie daher auch nur als einen Ersatz für dieses. Im Uebrigen s. die Bemerkungen am Schluss des vorigen § und wegen der Theorie der Färbung § 219.

12. Kapitel.

Färben mit Hämatoxylin- oder Hämateïngemischen.

243. Theorie des Färbens mit Hämatoxylingemischen. Es unterliegt keinem Zweifel mehr (s. Mayer in: Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1891 p. 170), dass das wirksame Prinzip in den sogenannten Hämatoxylingemischen der Histologen nicht Hämatoxylin, sondern Hämateïn ist, und dass dieses aus jenem durch die „Reifung“, d. h. durch Oxydation entsteht. Bevor also die Gemische reif sind, taugen sie nicht zum Färben. Früher hat man sie einfach durch Stehen an der Luft reifen, d. h. sich oxydiren lassen; kräftige Oxydationsmittel hingegen, z. B. Kaliumhypermanganat oder Wasserstoffhyperoxyd (s. auch Unna in: Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1892 p. 483) verwandeln die farblose Lösung des Hämatoxylins augenblicklich in die braune des Hämateïns.

Aber auch das Hämateïn färbt allein nicht in befriedigender Weise, sondern verleiht im Allgemeinen den Objekten nur einen hellbraunen Ton, und es verhält sich damit ähnlich wie mit der Karminsäure (s. § 218), die auch allein nur diffus und ganz schwach tingirt. Die gewöhnlichen Gemische (nicht also das von Weigert oder das von Benda etc.) enthalten eben alle Alaun oder ein anderes Thonerdesalz, und nach Mayer kommt die Färbung dadurch zu Stande, dass sich in den Geweben (besonders in den Kernen) die Verbindung Hämateïn-Thonerde niederschlägt.

Die gewöhnliche Redeweise, man färbe mit Hämatoxylin, ist, wie aus dem Gesagten hervorgeht, ungenau; es muss heissen, man färbe mit Hämateïnthonerde, oder man sollte wenigstens angeben, welches Gemisch man benutzt, also z. B.: gefärbt mit Hämatoxylin nach Böhmer, mit Hämateïn IA von Apáthy, mit Hämatoxylin nach Ehrlich u. s. w. Mayer hat deswegen für sein Gemisch von Hämateïn, Alaun und Wasser den kurzen Ausdruck Hämalaun eingeführt. Neuerdings (Anat. Anzeiger 13. Bd. 1897 p. 313) zeigt Mayer auch, dass der Hauptbestandtheil des Chromatins der Kerne, die Nucleïnsäure, sich mit

Hämateïn allein nicht färbt, dagegen aus Alaun Thonerde und aus Hämalaun Hämateïnthonerde an sich bindet.

Die Reifung der Hämatoxylingemische, die also neben dem Hämatoxylin hauptsächlich ein Thonerdesalz enthalten und frisch bereitet in der Regel selber farblos sind, dauert an der Luft meist Monate, wenigstens aber, wenn man die Flaschen absichtlich nicht gut verschliesst, Wochen lang. (Nimmt man statt des Hämatoxylins das Hämateïn, so sind sie sofort zum Gebrauche fertig.) Auch oxydirt sich nicht zugleich alles Hämatoxylin; man kennt demnach den Gehalt an wirksamem Farbstoffe nie auch nur einigermaassen genau. Andererseits schreitet die Oxydation auch langsam, aber unaufhörlich fort und verwandelt das Hämateïn in Körper, die nicht mehr färben; so sind denn die gewöhnlichen Hämatoxylingemische ganz inkonstante Gemenge von unreifen, reifen und überreifen Bestandtheilen, daher auch in ihrer Wirkung häufig unberechenbar. Endlich aber ändert sich im Laufe der Zeit in den Gemischen, die Alaun enthalten, die Reaktion gegen Lakmuspapier: sie werden weniger sauer und färben dann auch manchmal anders als zu Beginn (s. unten § 809).

Bevor man das Hämatoxylin (oder das Hämateïn) kannte, hat man zum Färben Blauholz (Campecheholz) oder das rohe käufliche Extrakt daraus unter Zugabe von Alaun verwandt, ist aber mit Recht davon abgekommen. Ganz vor Kurzem empfiehlt jedoch Spuler (Sitz. Ber. Physik. Med. Ges. Erlangen 27. Heft 1896 p. 937) der Billigkeit halber das Extrakt und (Anat. Hefte 1. Abth. 7. Bd. 1896 p. 131) sogar das Holz.

244. Konstantes Gemisch nach Unna (Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1892 p. 483). Setzt man einem bereits reifen Hämatoxylingemische ein reduzirendes Agens in der richtigen Weise zu, so verändert sich jenes nicht weiter. Unna löst 1 g Hämatoxylin und 10 g Alaun in 100 ccm Alkohol und 200 ccm Wasser, lässt das Gemisch 2—3 Tage lang stehen, sodass es bereits einigermaassen färbt, und fügt nun 2 g sublimirten Schwefel hinzu. Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p. 309) findet, dass der Schwefel das Gemisch doch nicht lange konstant erhält, und empfiehlt seinerseits das Glychämalaun (§ 251). Relativ unveränderliche Gemische sind übrigens das von Ehrlich (§ 255) und das von Apáthy (§ 256).

245. Hämateïn. Folgende Angaben sind den Schriften von Mayer (s. oben § 217 und 243) entnommen. Das Hämateïn ist schwer, aber ganz in destillirtem Wasser, leichter in Alkohol löslich; die gelbbraune Lösung bleibt auch bei Zusatz von Essigsäure klar. Alkalien lösen es blauviolett auf. Ganz rein ist es bisher nur von Geigy & Co. in Basel zu beziehen, indessen in seiner Verbindung mit Ammoniak, als Hämateïn-Ammoniak, kommt es auch sonst im Handel vor

und lässt sich leicht selbst bereiten (§ 246). Es ist in dieser Verbindung viel löslicher in Wasser und Alkohol und leistet im Uebrigen dieselben Dienste wie das reine Hämateïn.

246. Hämateïn-Ammoniak (Mayer in: Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1891 p. 172). Man löse 1 g Hämatoxylin durch Erwärmen in 20 g destillirtem Wasser, filtrire, wenn nöthig, gebe 1 ccm Ammoniak (von 0.875 spez. Gew.) hinzu und giesse die Flüssigkeit in eine Schale, die so geräumig ist, dass jene darin nicht höher als $^1/_2$ cm steht. Man lässt nun bei gewöhnlicher Temparatur an einem staubfreien Orte das Wasser und Ammoniak verdunsten und kratzt den Rückstand, der etwa 1 g betragen muss, von der Schale los. Beschleunigung der Operation durch Abdampfen in der Wärme liefert Nebenprodukte, die in Alkohol unlöslich sind; auch darf man die Flüssigkeit nur mit Stäben (oder Spateln etc.) aus Glas, Porzellan oder Platin umrühren.

247. Charakter der Färbungen mit Hämateïn-Thonerde (fälschlich: mit Hämatoxylin). Die Färbungen fallen je nach der Zusammensetzung des Färbgemisches in verschiedenen Tönen von Blau bis Roth aus: neutrale Gemische tingiren blau, saure roth. Gewöhnlich verleiht man nun den Geweben, die aus einem sauren Gemische kommen, einen blauen Ton, indem man sie in ganz schwaches Ammoniak bringt, und glaubt, das Blau komme durch die Neutralisation der Säure zu Stande, die ihrerseits die Ursache des rothen Tones sei. Indessen wirkt nach Mayer das Ammoniak anders: es fällt die Thonerde aus, und diese reisst das Hämateïn mit nieder (ohne Thonerde würde das Hämateïn durch das Ammoniak ja violett werden). Das gleiche Resultat aber erhält man durch Auswaschen mit Brunnen- oder Leitungswasser, das in der Regel etwas alkalisch reagirt, ferner durch einen Zusatz von Natriumbikarbonat oder von Kalium- oder Natriumacetat (1 : 50 bis 1 : 100). Letzteres ist auch vorzuziehen, da Ammoniak zarten Objekten leicht schadet. Natürlich ist dies ein anderer Vorgang als der des einfachen Neutralisirens von Geweben, die man mit einer Säure behandelt hatte, um die Ueberfärbung zu korrigiren; denn die Neutralisation ist im letzteren Falle nöthig, weil sonst die Farbe leicht mit der Zeit ganz verblassen möchte.

Manche Hämateïngemische haben eine grosse Neigung zum Ueberfärben. Man zieht das Zuviel hinterher leicht durch Auswaschen mit ganz schwachen Säuren (z. B. mit Salzsäure von $^1/_{10}$, $^1/_5$ oder $^1/_2$ %, oder Oxalsäure oder Weinsteinsäure) aus, muss dann

aber die Säure gründlich wieder entfernen, entweder durch viel reines Wasser (oder Alkohol), oder noch besser durch Ammoniak oder Natriumbikarbonat ($^1/_{10}$ %; nach Wistinghausen setzt man dies zum 70 %igen Alkohol). Am besten vermeidet man natürlich von vornherein die Ueberfärbung, indem man die Objekte nicht zu lange in den Färbgemischen lässt. Auch sehr schwache Gemische überfärben nicht leicht, selbst nicht, wenn man die Objekte Tage lang darin lässt, aber dann resultirt keine reine Kernfärbung, wenigstens nicht, wenn man das starke Färbgemisch nur mit Wasser verdünnt. Will man also reine Kernfärbung haben, so muss man entweder ein starkes Gemisch nehmen oder es mit einer Alaunlösung verdünnen oder es bei der Verdünnung mit Wasser zugleich etwas ansäuern.

Die Farbe hält sich in Balsam, bleicht aber gern etwas und unter Umständen sogar stark aus. Hat man beim Färben irgendwie Säuren angewandt, so muss man sie vor dem Einschliessen in Balsam sorgfältig auswaschen (s. oben). Auch darf man nie Balsam nehmen, der mit Terpentinöl verdünnt ist (s. auch § 249). In Glycerin hält sich die Farbe nach älteren Angaben nicht zuverlässig, während Mayer wenigstens für einige Monate das Gegentheil garantirt; allerdings darf es nicht sauer sein.

248. Allgemeine Bemerkungen. Die Hämateïngemische gewähren vor den Theerfarben und den Karmingemischen den Vortheil, dass sie auch Objekte, die mit Osmium- oder Chromgemischen konservirt sind, relativ gut färben und dass sie überhaupt stärker tingiren als die Karmingemische. Ausserdem braucht man sie zur Färbung des Nebenkerns, der achromatischen Kernfiguren, der Nerven und anderer histologischer Spezialitäten. Je nach der Art ihrer Anwendung liefern sie reine Kernfärbungen oder auch Plasmafärbungen, indessen kommen die meisten unter den letzteren nicht durch die Verbindung mit Thonerde, sondern mit Eisen, Chrom etc. zu Stande. (Genaueres in § 260 ff. und in 706 ff.)

A. Verbindungen des Hämateïns mit Thonerde.

249. Hämalaun nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1891 p. 172). 1 g Hämateïn (oder Hämateïn-Ammoniak) wird durch Erwärmen in 50 ccm Alkohol von 90 % gelöst und zu einer Lösung von 50 g

Alaun in 1000 ccm destillirtem Wasser gegossen. Nach dem Erkalten wird eventuell filtrirt.[1])

Das Hämalaun ist sofort zum Gebrauch bereit; es ist eine dunkle Flüssigkeit etwa von der Farbe des Boraxkarmins, wird aber allmählich mehr blauviolett, besonders in Flaschen von leicht zersetzbarem Glase, und bildet auch im Laufe der Zeit sowohl an den Wänden der Flasche als auf dem Boden und an der Oberfläche Niederschläge; man schöpft daher am besten mit einer Pipette mitten aus der Flasche und wischt die Pipette, bevor man das Hämalaun aus ihr herausfliessen lässt, aussen gut ab. Es färbt Schnitte manchmal fast augenblicklich, jedenfalls aber in sehr kurzer Zeit, und eignet sich auch vorzüglich zum Durchfärben; dies kann allerdings 24—48 Stunden dauern, und das Auswaschen mitunter ebenso lange. In der Regel resultirt in den Schnitten eine reine Kernfärbung, und jedenfalls lässt sie sich durch Auswaschen mit Alaunwasser (1—2 $^0/_0$iger Lösung von Alaun) erzielen; dies gilt auch vom Durchfärben. Man muss aber unter allen Umständen den Alaun (des Hämalauns oder des Alaunwassers) gut wieder auswaschen, da er sich sonst im Balsam als Kristalle bemerkbar macht, und thut auch gut daran, nach dem destillirten Wasser noch Leitungswasser oder ein anderes Mittel zum Bläuen der Farbe (s. oben p. 150) anzuwenden. Auch zum Verdünnen des Hämalauns (bis auf $^1/_{20}$) nimmt man am besten Alaunwasser, nie aber Leitungswasser. Beim Uebertragen in Balsam (oder Paraffin etc.) vermeide man Bergamott- und Nelkenöl und verwende Chloroform, Xylol oder Benzol; auch der Balsam sei nur in einem dieser 3 Stoffe gelöst (s. § 437 u. 438).

Hämalaun lässt sich mit Karmalaun, Säurefuchsin, Indigkarmin etc. zu Doppelfärbungen (§ 345 ff.) mischen; besser noch färbt man aber mit diesen nachher besonders.

Gerade wie bei dem sogenannten Böhmerschen Hämatoxylin (§ 253) braucht man sich bei dem Hämalaun nicht genau an die obigen Proportionen zu halten, sondern kann ein Hämalaun extemporiren, indem man zu einer Alaunlösung von gewünschter Stärke einige Tropfen einer Lösung von Hämateïn in Alkohol oder Glycerin hinzufügt. Oder man behandelt die Objekte nacheinander mit einer wässerigen Lösung von Hämatoxylin und von Alaun (Nissen in: Arch. Mikr. Anat. 26. Bd. 1886 p. 338; Kostanecki & Wierzejski, ibid. 47. Bd. 1896 p. 314, und manche Andere), oder auch umgekehrt, und erhält dann je nach den Umständen nur die Kerne oder auch das Plasma gefärbt.

---

[1]) Neuerdings löse ich das Hämateïn nicht in Alkohol, sondern durch Zerreiben im Mörser mit ganz wenig Glycerin. [M.]

250. Saures Hämalaun nach Mayer (ibid. p. 184 Anm.). Es ist einfach Hämalaun mit 2 % Eisessig (oder 4 % Essigsäure von 50 %). Anwendung wie oben, Auswaschen mit Leitungswasser zur Bläuung der Farbe erforderlich. Färbt noch präziser als das Hämalaun und hält sich auch länger unzersetzt.

251. Glychämalaun nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p. 310). Man zerreibt 0,4 g Hämateïn (oder Hämateïn-Ammoniak) in einem Mörser mit einigen Tropfen Glycerin und setzt dazu eine Lösung von 5 g Alaun in 30 ccm Glycerin und 70 ccm destill. Wasser. Eventuell zu filtriren. Hält sich vorzüglich (etwas Alaun kann auskristallisiren), und wirkt ziemlich rasch und sehr stark, giebt aber durchaus keine scharfe Kernfärbung; will man diese, so muss man wenigstens mit Alaunwasser, mitunter sogar mit schwacher Säure auswaschen.

252. Hämalaun nach Hansen (Z. Anzeiger 18. Jahrg. 1895 p. 158). Hansen oxydirt ein Gemisch von Alaun und Wasser durch Kochen mit Kaliumhypermanganat und ist der Ansicht, dieses Hämalaun halte sich, da die Bakterien durch das Kochen vernichtet seien, länger als das gewöhnliche. Bei mir hat es aber schon nach einigen Tagen eine Haut und einen starken Niederschlag gebildet, und Mayer schreibt mir dasselbe. Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p. 309) hält die Gegenwart des Mangans in der Lösung für unvortheilhaft und räth statt dessen an, das Hämatoxylin in starkem Alkohol zu lösen, nur kurze Zeit mit dem Hypermanganat in Berührung zu lassen und dann gleich in der richtigen Menge zur Alaunlösung (von 5 %) zu geben.

253. Hämatoxylingemisch nach Böhmer (Arch. Mikr. Anat. 4. Bd. 1868 p. 345; Aerztl. Intelligenzbl. Baiern 1865 p. 382). Zu einem Uhrglase voll einer Alaunlösung (1:240 Wasser) setze man einige Tropfen einer braun gewordenen Hämatoxylinlösung (1:12 absol. Alkohol). Nur noch von historischem Interesse als das älteste Gemisch dieser Art.

Böhmer wäscht die Schnitte mit einer Lösung von Weinsteinsäure in Alkohol aus und schliesst sie in Rizinusöl oder Glycerin ein. Er hat auch schon beobachtet, dass die mit Chromgemischen oder Kupfervitriol behandelten Objekte sich mit Hämatoxylin allein (in Wasser gelöst) färben, allerdings weniger distinkt als bei Gegenwart von Alaun.

254. Hämatoxylingemisch nach Delafield (Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 288), fälschlich: nach Grenacher oder Prudden. Zu 400 ccm einer gesättigten Lösung von Ammoniakalaun (1 Theil löst sich in etwa 11 Theilen Wasser) setzt man eine Lösung von 4 g Hämatoxylin in 25 ccm starkem Alkohol und lässt das Gemisch in einer offenen Flasche 3—4 Tage stehen. Dann filtrirt man, giebt 100 ccm Glycerin und ebenso viel Methylalkohol hinzu, filtrirt wieder, lässt das Gemisch so lange (wenigstens 2 Monate) offen stehen, bis es dunkel genug geworden ist, und schliesst erst dann die Flasche. Zum Färben verdünnt

man es mit viel Wasser, lässt aber die Objekte, da es sehr stark färbt, nicht zu lange darin. Bütschli (Untersuch. Mikr. Schäume Leipzig 1892 p. 80; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 197) empfiehlt als saures Hämatoxylin eine sehr starke Verdünnung des Delafieldschen Gemisches mit so viel Essigsäure, dass sie entschieden roth ist; sie färbt dann die Kerne schärfer. — S. auch unten § 673 die Angaben von Stilling & Pfitzner.

255. Hämatoxylingemisch nach Ehrlich (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 150). 2 g Hämatoxylin, 100 ccm absoluter Alkohol, 10 ccm Eisessig, je 100 ccm Glycerin und Wasser, endlich Alaun im Ueberschuss. Man lässt dies Gemisch in einer offenen Flasche dunkelroth werden, es hält sich dann gut verschlossen Jahre lang unverändert. Schnitte färbt es sehr rasch, soll auch Stücke gut durchfärben und nicht überfärben. Von allen älteren Gemischen giebt dieses die schärfste Kernfärbung. — Mann (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1895 p. 487) nimmt statt des Hämatoxylins gleichviel Hämateïn.[1])

256. Hämateïnlösung I. A. von Apáthy (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1897 p. 712). Man mischt gleiche Theile Glycerin, einer 9 $^0/_0$ igen Alaunlösung (9 $^0/_0$ Alaun, 3 $^0/_0$ Eisessig und $^1/_{10}$ $^0/_0$ Salicylsäure in destill. Wasser gelöst) und einer 1 $^0/_0$igen Hämateïntinktur. Diese wiederum ist lediglich eine 1 $^0/_0$ige Lösung von Hämatoxylin in 70 $^0/_0$igem Alkohol, die in nicht ganz voller Flasche bei gewöhnlicher Temperatur etwa 6—8 Wochen lang gestanden hat und daher bereits eine ziemliche Menge Hämateïn enthält. Die Tinktur sowohl als die Hämateïnlösung I. A. halten sich Jahre lang unverändert. Apáthy benutzt letztere besonders zur Färbung der nervösen Primitivfibrillen; schon daraus geht hervor, dass sie nicht nur die Kerne färbt. Sie eignet sich sowohl für Schnitte als auch zum Durchfärben.

257. Hämacalcium nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1891 p. 182). Hämateïn (oder Hämateïn - Ammoniak) 1 g, Chloraluminium 1 g, Chlorcalcium 50 g, Eisessig 10 ccm (oder Essigsäure von 50 $^0/_0$ 20 ccm), Alkohol von 70 $^0/_0$ 600 ccm. Man reibt die beiden ersten Stoffe fein, löst sie in der Säure und dem Alkohol heiss oder kalt und setzt zuletzt das Chlorcalcium hinzu.

Das Gemisch ist roth violett; färbt es zu roth, so kann man dem durch Auswaschen mit einer 2 $^0/_0$ igen Lösung von Chloraluminium in 70 $^0/_0$ igem Alkohol oder mit einer $^1/_2$—1 $^0/_0$igen Lösung von Kaliumacetat in absolutem Alkohol abhelfen; gewöhnlich aber werden die Objekte schon durch das Waschen mit neutralem Alkohol violett oder blau.

---

[1]) Nach meinen Erfahrungen viel zu viel. Auf 300 ccm genügen 0,4 Hämateïn vollauf, also der fünfte Theil. Das Mannsche Gemisch färbt alles Mögliche. [M.]

Das Hämacalcium setzt nach einigen Monaten (Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1892 p. 499) stark ab. Dies lässt sich, allerdings auch nicht völlig, dadurch vermeiden, dass man sich zwei Gemische macht, jedes mit der Hälfte des Alkohols und der Säure und das eine mit allem Chlorcalcium, das andere mit allem Chloraluminium und Hämateïn; man nimmt dann beim Gebrauche aus jeder Flasche gleich viel.

Bei manchen Objekten dringt das Hämacalcium nicht gut ein; man kann das vermeiden, indem man es ansäuert oder besser noch die Objekte vor dem Färben einige Zeit in angesäuerten Alkohol legt. Ueberhaupt dürfen die Objekte nicht alkalisch reagiren. Wird hierauf geachtet, so ist das Ausziehen der Farbe mit saurem Alkohol nicht nöthig. Bei manchen Objekten (z. B. Hydroiden) dringt das Hämacalcium besser ein, wenn man es mit 1/8 seines Volumens an Glycerin verdünnt oder die Menge des Aluminiumchlorids (bis auf das 8fache) erhöht. — Das Hämacalcium färbt nicht so gut wie Hämalaun; überhaupt ist Mayer der Ansicht, kein alkoholisches Hämateïngemisch könne so distinkt färben wie die wässerigen, und er empfiehlt das Hämacalcium auch nur als Ersatz des Kleinenbergschen Gemisches (§ 258), da es leichter anzufertigen und konstanter in seiner Wirkung sei. Immerhin giebt es Objekte, die keine wässerigen Färblösungen vertragen, wenn sie einmal in Alkohol gewesen sind, und für solche eignet sich von den Karmingemischen besonders das Parakarmin, von den Hämateïngemischen das Hämacalcium. S. auch § 624 (Eisig).

258. Hämatoxylingemisch nach Kleinenberg (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 19 1879 p. 208). Wenig rationell und konstant in Zusammensetzung und Wirkung; s. die Kritik von Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1891 p. 174) und Squire (Methods p. 25), ferner die Formeln von Squire (l. c.) und Wistinghausen (Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1891 p. 41).

Eine Menge veralteter Formeln zur Bereitung von „Hämatoxylinen“, d. h. Gemischen, die Hämateïn und ein Thonerdesalz enthalten, findet man in den früheren englischen Auflagen dieses Buches.

B. Andere Verbindungen des Hämateïns oder Hämatoxylins.

259. Allgemeines. Für die Mikrotechnik kommen einstweilen von den Verbindungen des Hämateïns ausser mit Thonerde noch die mit Eisen, Kupfer, Chrom und Vanadium in Betracht. Heidenhain (Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 199) hat auch Magnesium, Strontium etc.

sowie viele Schwermetalle ohne Erfolg versucht. Von jenen Verbindungen sollen die, welche ausschliesslich oder hauptsächlich zur Untersuchung der Nerven in Gebrauch sind (Methode von Weigert, von Pal etc.), dort besprochen werden, hier dagegen nur die von allgemeiner Anwendbarkeit. Die Färbungen mit Hämatoxylin-Eisen (§ 262 und 263) eignen sich nur für Schnitte; die mit H.-Chrom (§ 260 und 261) auch zum Durchfärben. S. auch § 253.

260. Hämatoxylin-Chrom nach R. Heidenhain (Arch. Mikr. Anat. 24. Bd. 1885 p. 468; 27. Bd. 1886 p. 383). Man legt die Objekte 12—24 Stunden lang in eine 1/3 %ige Lösung von Hämatoxylin in destillirtem Wasser, bringt sie dann auf eben dieselbe Zeit in eine 1/2 %ige Lösung von Kaliummonochromat, die man nach Bedarf mehrere Male erneuert, und wäscht den Ueberschuss des Chromates mit Wasser aus. (Ursprünglich nahm Heidenhain eine stärkere Lösung von Hämatoxylin (1/2—1 %) und Kaliumbichromat, aber die Kernfärbung war nicht so scharf.) Am besten färben sich die Objekte, wenn sie mit Alkohol oder Pikrinsäure fixirt worden sind, aber die mit Chromsäure fixirten färben sich auch, wenn sie vorher sehr gut ausgewaschen worden sind, ebenso die mit Flemmings Gemisch fixirten. Hat man Sublimat genommen, so muss man es sehr gut mit fliessendem Wasser wegschaffen, sonst bilden sich schwarze Präcipitate (s. Tornier in: Arch. Mikr. Anat. 27. Bd. 1886 p. 181); am besten färbt man dann im Dunkeln. (Tornier kannte offenbar das Jod zum Entfernen des Quecksilbers aus den Geweben nicht.)

Die Farbe ist schwarz bis grau, scharf und sehr reich abgestuft, sowohl für das Plasma als auch für die Kerne. Die Methode eignet sich zum Durchfärben. Man kann die Objekte nach Belieben durch längeres Verweilenlassen im Chromate entfärben. Wäscht man hingegen mit Alaun aus, so erhält man eine blaue Färbung.

261. Apáthy's Modifikation (Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 47) unterscheidet sich von der vorigen Methode dadurch, dass nur Alkohol von 70 bis 80 % zur Verwendung kommt: die Objekte gelangen zuerst in eine 1 %ige Lösung von Hämatoxylin und dann entweder halb so lange (wenn es Schnitte von 10—15 μ sind) oder doppelt so lange (Schnitte von 25—40 μ) in eine 1 %ige Lösung von Kaliumbichromat. Letztere Lösung macht man sich durch Vermischen einer 5 %igen wässerigen Lösung mit dem Vierfachen von 80—90 %igem Alkohol, und zwar unmittelbar vor dem Gebrauch, schützt sie auch sammt den Objekten darin vor dem Licht und erneuert sie mehrere Male. Ausgewaschen werden die Objekte ebenfalls im Dunkeln in 70 %igem Alkohol. Die Färbung soll durchsichtiger ausfallen, und die Objekte sollen mehr geschont werden als bei der Methode von Heidenhain.

Celloidinschnitte behandelt Apáthy (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 170) 10 Minuten mit der Hämatoxylinlösung, trocknet sie mit Fliesspapier ab und bringt sie im Dunkeln auf 5—10 Minuten in Alkohol von 70 %, dem nur einige Tropfen der 5 %igen Lösung von Kaliumbichromat zugesetzt worden sind.

Die Schnitte werden stahlblau bis stahlgrau; ohne das Abtrocknen würde sich das Celloidin mitfärben.

262. Hämatoxylin-Eisen nach Benda. Benda (Arch. Anat. Phys. Phys. Abth. f. 1886 p. 564) behandelte die Objekte nach einander mit Eisenalaun, Hämatoxylin und Chromsäure, erhielt aber amorphe Präcipitate in den Geweben und verfährt daher jetzt (Verh. Anat. Ges. 7. Vers. 1893 p. 161; Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 69) wie folgt. Die Schnitte von beliebig konservirten Objekten kommen auf 24 Stunden in Liquor ferri sulfurici oxydati Pharm. Germ., verdünnt mit dem Doppelten an Wasser, werden gut ausgewaschen (erst mit destillirtem, dann mit gewöhnlichem Wasser) und gelangen dann in eine 1 %ige wässerige Lösung von Hämatoxylin, worin sie schwarz werden müssen. Dann werden sie wieder gewaschen und differenzirt: entweder in 30 %iger Essigsäure, wobei man aber aufpassen muss, oder in schwächerer Essigsäure oder in stark (1:20) verdünntem Liquor ferri sulf. oxyd. — Siehe auch die nicht wesentlichen Bemerkungen von Eisen (Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 199).

Die Methode soll sich für allerlei Organe eignen und speziell ausgezeichnet die Axencylinder und die achromatischen Kernfiguren bei der Mitose färben; die letzteren mag man ausserdem mit Säurefuchsin nachfärben, und dann sind die Chromosomen, Centrosomen und Zwischenkörper schwarz, die Linin- und Spindelfasern roth. Ich finde nach sorgfältigem Vergleiche (Schnitte durch dasselbe Objekt dicht hinter einander, Vorbehandlung nach Benda und Heidenhain gleich lang, Färbung in derselben Hämatoxylinlösung), dass die Färbung nach Benda ganz genau so ausfällt, wie die nach M. Heidenhain (§ 263); auch erlaubt sie die Anwendung von Bordeauxroth, und sein Liquor ferri hält sich besser als Heidenhains Eisenalaun.

263. Hämatoxylin-Eisen nach M. Heidenhain (Festschr. Kölliker Leipzig 1892 p. 118; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 204). Man bringt die Schnitte erst 1/2 bis höchstens 3 Stunden lang in eine 1 1/2—4 %ige Lösung von Eisenalaun (schwefelsaurem Eisenoxyd-Ammoniak, in klaren violetten Kristallen; das grüne Oxydul-Doppelsalz taugt dazu nicht; die Kristalle dürfen nicht gelb und angelaufen aussehen, auch darf man die Lösung nicht erwärmen, s. Arch. Mikr. Anat. 43. Bd. 1894 p. 435). Dann wäscht man sie mit Wasser ab, schafft sie auf 1/2 Stunde in eine etwa 1/2 %ige Lösung von Hämatoxylin (Hämateïn wirkt nicht so gut), wäscht sie wieder und bringt

sie zur Differenzirung von Neuem in die Eisenlösung. Von Zeit zu Zeit werden sie herausgenommen, in Leitungswasser gelegt und unter dem Mikroskop besehen; sind sie gut differenzirt, so wäscht man sie in fliessendem Wasser wenigstens 1/4 Stunde, höchstens 1 Stunde lang und führt sie in Balsam über.

Je nach der Länge der Bäder, die man den Schnitten hat angedeihen lassen, fallen die Resultate verschieden aus: sind die Schnitte in jedem nur etwa 1/2 Stunde gewesen, so werden sie blau, und zwar sind alle Bestandtheile der Kerne sehr intensiv und hoch differenzirt gefärbt; dauerten die Bäder aber 12—18 Stunden, und war die Differenzirung ebenfalls langsam, so werden sie schwarz, und dann sind auch andere Bestandtheile der Zelle sehr dunkel gefärbt. (Mayer theilt mir brieflich seine Zweifel hieran mit, und ich muss ihm nach eigener Erfahrung darin beistimmen.)

Ich kann diese Methode nur auf das Wärmste empfehlen: sie differenzirt nicht nur das Plasma in werthvoller Weise, sondern gewährt auch bei gutem Gelingen so scharfe Bilder der chromatischen Bestandtheile des Kerns, dass diese stärkere Linsen vertragen als die Färbungen mit Hämalaun oder Gentianaviolett. Die Objekte dürfen sowohl in Alkohol als auch in Sublimat oder Flemmings Gemisch konservirt sein. Auch ist die Methode leicht zu befolgen, scheint mir aber leider etwas launenhaft zu sein.

Die Schnitte dürfen nach Heidenhain nicht dicker als 8 μ sein, indessen habe ich dies nicht für nöthig befunden. Die Präparate sollen in Balsam durchaus haltbar sein. Die Präcipitate, die zuweilen in den Geweben auftreten, sind nicht sehr schlimm, und bei Material, das nach Flemming oder Hermann konservirt worden ist, sind sie mir überhaupt nicht aufgetreten.

Ueber die Vorfärbung mit Bordeauxroth s. § 635.

Neuerdings (Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 186) giebt Heidenhain noch genauere und etwas abgeänderte Anweisungen zum obigen Verfahren, speziell mit Rücksicht auf die Färbung seiner Centralkörper. Die Schnitte sollen absolut gleichmässig und höchstens 6 μ, lieber aber 3 μ dick sein und mit Wasser aufgeklebt werden. Die Eisenlösung ist 2 1/2 %ig und soll 6—12 Stunden wirken, und statt der frischen Hämatoxylinlösung muss eine wenigstens 4 Wochen alte (1 g Hämatoxylin, 10 ccm Alkohol [wie stark?], 90 ccm Wasser) verwandt werden, die also reichlich Hämateïn enthält; diese nimmt man so lange, bis sie total verdorben ist, denn sie wird durch steten Gebrauch immer besser, lässt die Schnitte 24—36 Stunden darin, differenzirt sie dann in der Eisenlösung und bringt sie durch die Alkohole und Xylol (ja keine ätherischen Oele!) in

Xylolbalsam. Die Waschungen beim Uebertragen der Präparate aus einem Bade ins andere etc. müssen sehr sorgfältig sein.

Mayer (Anat. Anzeiger 13. Bd. 1897 p. 318) zeigt, dass zwar in Hämalaun und den analogen Gemischen ausser der Thonerde Hämateïn vorhanden ist, in dem Heidenhainschen Gemische dagegen eine noch höhere, unbekannte Oxydationsstufe des Hämatoxylins. — R. Krause (Arch. Mikr. Anat. 45. Bd. 1895 p. 94) setzt der Hämatoxylinlösung 3—5 % einer 1 %igen Lösung von Kaliumhypermanganat zu, oxydirt also das Hämatoxylin, und färbt mit Rubin S in 90 %igem Alkohol nach (auf 30 ccm 1 Tropfen konzentr. wässeriger Lösung).

264. Hämatoxylin-Eisen nach Bütschli (Untersuch. Mikr. Schäume 1892 p. 80; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 197). Die Schnitte kommen nach einander in eine schwache Lösung von Eisenacetat, in Wasser und in eine 1/2 %ige Lösung von Hämatoxylin. Sie werden ganz tief braunschwarz oder blauschwarz. Die Methode, von B. für Schnitte von Protozoen angewandt, scheint nicht allgemein brauchbar zu sein. — Ueber das Weigertsche Verfahren zum Färben der Mitosen s. unten § 698.

265. Hämatoxylin-Kupfer nach Benda (Arch. Mikr. Anat. 30. Bd. 1887 p. 49). Die Schnitte von Material, das in Flemmings Gemisch konservirt worden ist, kommen zunächst in eine konzentrirte Lösung von Kupferacetat (24 Stunden lang bei 40 ° C., sonst 48 Stunden) und dann nach gutem Auswaschen mit Wasser auf einige Minuten in eine 1 %ige wässerige Lösung von Hämatoxylin, wo sie dunkelgrau bis schwarz werden. Entfärbt werden sie bis zu hellgelb in 1/5 %iger Salzsäure und gelangen dann zur Entfernung der Säure wieder in die Kupferlösung, wo sie blaugrau werden; dann werden sie gewaschen, entwässert und in Balsam eingeschlossen. (S. hierzu Piersol in: Amer. Month. Micr. Journ. Vol. 8 1887 p. 154; Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 499). Die Methode soll sich besonders zum Studium der Spermatogenese eignen, scheint mir aber gar nicht leicht zu sein.

266. Hämatoxylin und Phosphormolybdänsäure nach Mallory (Anat. Anzeiger 6. Jahrg. 1891 p. 375; s. auch Schiefferdecker in: Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 341) soll speziell für das Centralnervensystem dienen.

267. Hämatoxylingemische nach Minot (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 177).

---

13. Kapitel.

Allgemeines über Theerfarbstoffe.

268. Basische, saure und neutrale Theerfarbstoffe. Nach einem Prinzipe, das von Ehrlich (Zeit. Klin. Med. 1. Bd. 1880 p. 555) in die Histologie eingeführt wurde, theilt man gewöhnlich die Theerfarbstoffe in basische, saure und neutrale. Unter einem basischen Farbstoff versteht man einen solchen, worin das färbende Prinzip als Base mit einer farblosen Säure verbunden ist; z. B. das Fuchsin (Magenta) = salzsaures Rosanilin, verdankt seine färberischen Eigenschaften nicht der Salzsäure, sondern dem Rosanilin. In einem sauren Farbstoff ist das färbende Prinzip eine Säure oder wirkt als solche; so ist z. B. das Säurefuchsin das Natron- (oder Ammoniak-)salz der Rosanilintrisulfosäure und verdankt seine Färbkraft nicht der Basis, sondern der Rosanilintrisulfosäure. Ferner ist das pikrinsaure Ammoniak in Ehrlichs Sinn ein saurer Farbstoff. Als neutral wäre nach Ehrlich z. B. das pikrinsaure Rosanilin zu bezeichnen; solche Verbindungen, die also durch Mischung von sauren und basischen (z. B. von Säurefuchsin und Methylenblau) entstehen, sollen allerdings gewöhnlich in Wasser unlöslich sein und daher beim Mischen ausfallen, sich aber bei Ueberschuss des sauren Farbstoffes wieder lösen. [1])

Nach Ehrlich nun sind die basischen Farbstoffe im Allgemeinen Kernfarbstoffe, d. h. sie haben eine besondere Affinität zum sogenannten Chromatin der Kerne und geben daher meist eine scharfe Kernfärbung. Die sauren hingegen sind nach ihm meist Plasmafarbstoffe, d. h. sie haben keine besondere Affinität zum Cytoplasma und zu den Intercellularsubstanzen. Endlich zeigen die neutralen Farbstoffe spezielle

[1]) Die Bezeichnung eines nicht sauer reagirenden chemischen Körpers, wie z. B. des Ammon[illegible] als eines sauren Farbst[illegible] führt leicht irre; leider ist aber in den meisten Schriften diese Nomenclatur so verbreitet, dass einst- [illegible] (M.)

Affinität zu gewissen Bestandtheilen der Zelle, und unter ihnen befinden sich einige sehr wichtige Farbstoffe für die Zellgranula.

Ich möchte die Genauigkeit oder Gründlichkeit der Beobachtungen, worauf die obigen allgemeinen Anschauungen basiren, oder ihren theoretischen Nutzen nicht einen Augenblick anfechten, muss aber doch sagen, dass eine allgemeine Klassifikation der Theerfarbstoffe für die Histologen mit vielen Erläuterungen und Einschränkungen zu versehen ist. Denn in der Praxis haben wir nicht nur die Affinität eines Farbstoffes zu dem oder jenem Elemente der Zelle in Betracht zu ziehen, wie sie sich beim progressiven Färben unter eng begrenzten Bedingungen verräth, sondern müssen auch auf die Resistenz der Färbung gegen die Media zum Auswaschen, Entwässern und Uebertragen in Balsam achten, kurz darauf, wie sich der Farbstoff verhält, wenn man ihn regressiv benutzt. Dies ist aber besonders wichtig bei den Theerfarbstoffen, denn gerade sie dienen ja zur regressiven Färbung von Schnitten, die nachher durch Alkohol hindurch in Balsam kommen sollen. Ehrlich nun hat bei seinen Experimenten hierauf keine Rücksicht genommen: er arbeitete an sogenannten Deckglaspräparaten von isolirten Zellen (aus Blut und Lymphe), vermied so das Auswaschen und umging das Entwässern ganz, da er die Präparate nach dem Färben einfach trocknete. Daher entsprechen seine beiden Kategorien (basische und saure Farbstoffe) durchaus nicht genau den Kern- und Plasmafarbstoffen.

So ist z. B. Orange ein saurer Farbstoff, tingirt aber, wie ich finde, regressiv angewandt, das Chromatin und die plasmatischen Nucleoli sehr scharf, darf also nicht ausschliesslich als Plasmafarbstoff gelten, obwohl es auch das Plasma sehr gut tingirt. Ferner ist Säurefuchsin sauer und verhält sich im Allgemeinen entschieden als Plasmafarbstoff, tingirt aber regressiv unter Bedingungen, die ich nicht näher bezeichnen kann, zuweilen das Chromatin sehr kräftig. Safranin ist ein basischer Farbstoff, lässt sich aber mit geeigneten Beizen als Plasmafarbstoff benutzen. Auch Methylenblau ist basisch, färbt aber bekanntlich bei der sogenannten Tinction intra vitam der Nerven wesentlich das Plasma, während sich dabei die Kerne nebenher mehr zufällig tingiren. Endlich ist Nigrosin ein saurer Farbstoff, sollte daher wesentlich das Plasma färben, liefert aber bei ähnlicher Anwendung wie das Safranin eine kräftige Kernfärbung und tingirt dann das Cytoplasma nur schwach. Und das saure Bordeaux färbt Chromatin und Cytoplasma gleich gut.

Hieraus scheint mir hervorzugehen, dass Ehrlichs Verallgemeinerung, so richtig sie auch theoretisch sein mag, doch nicht Stich hält, wenn die Theerfarbstoffe nach ihrem Verhalten bei der gebräuchlichen Färbung von Schnitten klassifizirt werden sollen. Nur annähernd ist es richtig, dass im Allgemeinen die basischen Farbstoffe Kernfarbstoffe, die sauren Plasmafarbstoffe sind, denn diese Regel hat viele Ausnahmen.

269. Progressive und regressive Färbung mit Theerfarbstoffen. Nur wenige Theerfarbstoffe geben progressiv oder direkt (s. § 211) angewandt eine scharfe Kernfärbung. Methylgrün und Bismarckbraun haben eine starke Affinität zum Chromatin; manche andere, z. B. Safranin. Gentianaviolett und Dahlia, färben zwar bei Zusatz von Essigsäure in frischen Geweben die Kerne, sind aber in fast allen Fällen hierzu nicht so geeignet, wie jene beiden Farben, die in der Praxis eine Gruppe für sich bilden.

Auf der anderen Seite geben nur wenige Theerfarbstoffe eine reine Plasmafärbung, also ohne die Kerne zu tingiren. Die meisten färben diffus, aber hieraus resultirt dann in einigen Fällen durch die regressive oder indirekte Methode (s. gleichfalls § 211) eine scharfe und prächtige Kernfärbung.

Hier möge zunächst die regressive Methode behandelt werden, indess die Kernfarbstoffe im nächsten und die Plasmafarbstoffe im 16. Kapitel zur Erörterung kommen sollen.

Allgemeine Winke für die regressive Färbung mit Theerfarbstoffen.

Das Prinzip dieser Methode verdankt man E. Hermann (1875) und A. Böttcher (1869), aber sie ist allgemein als die Methode von Flemming bekannt, der sie in ihren Einzelheiten bedeutend verbessert hat (Arch. Mikr. Anat. 19. Bd. 1881 p. 317 und 742).

270. Das Färben. Nur Schnitte oder Material, das so dünn ist, wie diese, z. B. einige Membranen, können regressiv gefärbt werden. Die Farbbäder macht man je nach der Löslichkeit des Farbstoffes mit Alkohol. Wasser oder Anilin; sie mit Alkohol zu machen, wenn Wasser genügt, scheint keinen besonderen Zweck zu haben; die Hauptsache dabei ist. die Lösung möglichst konzentrirt zu machen. In der That sind auch die mit starkem Alkohol nicht ganz so gut wie die mit Wasser oder mit schwachem Alkohol. Ganz allgemein mag indessen Alkohol von 50 % ein gutes Medium sein. Die Schnitte müssen sehr sorg-

fältig gefärbt werden, ja, man kann sie in der Regel nicht zu lange färben: bei den starken Lösungen in Anilin genügen häufig einige Minuten bis $^1/_2$ Stunde, aber um ganz sicher zu gehen, thut man oft gut daran, 12—24 Stunden lang zu färben. Bis zu einem gewissen Grade widerstehen nämlich die Schnitte dem Auswaschen um so mehr, je länger sie gefärbt waren, und das ist ein Vortheil. Bei Untersuchungen auf Kerne sollte man die Lösungen in Anilin nur für Material verwenden, das in Chromosmiumessigsäure gut fixirt ist, denn das basische Anilin soll sonst leicht das Chromatin angreifen.

In Chromosmiumgemischen fixirte Objekte geben eine schärfere und elektivere Färbung als die in Sublimat etc. fixirten. Während des Färbens werden die Gewebe überfärbt und müssen nun durch Entfernung der überschüssigen Farbe differenzirt werden.

271. Das Differenziren. Dies geschieht gewöhnlich durch Alkohol, der entweder neutral oder mit Salzsäure angesäuert ist. Sind die gefärbten Schnitte lose (Celloidinschnitte), so bringt man sie in ein Uhrglas voll Alkohol, sind sie aufgeklebt, in einen Tubus voll Alkohol (dies ist besser als das blosse Uebergiessen damit). In beiden Fällen aber thut man gut daran, die Schnitte vorher mit Wasser eben abzuspülen oder sogar gut zu waschen.

Im Alkohol sieht man nun die überschüssige Farbe aus den Schnitten in Wolken oder Streifen ausströmen, erst rasch, dann langsamer. Zuletzt kommt der Moment, wo sie gerade aufhören will zu strömen; die Schnitte sind blass und ziemlich durchsichtig und, wenn es sich um Chromosmium-Objekte handelt, ändern sie auch ihre Farbe, indem nun ihre Grundfarbe zum Vorschein kommt (z. B. bei Verwendung von Safranin gehen sie von Dunkelroth in zartes Purpurn über). Jetzt ist die Differenzirung beendet, und das weitere Auswaschen mit Alkohol muss sofort unterbrochen werden (s. § 273).

Allgemein wird angegeben, man solle zum Differenziren absoluten Alkohol nehmen, indessen reicht auch 95 %iger völlig aus.

Den sauren Alkohol verwendet man besser nur bei Material, das gut mit Flemmingschem Gemisch fixirt worden ist, weil er sonst Schwellungen verursachen könnte. Ferner zieht er die Farbe viel rascher aus den ruhenden Kernen als aus den Mitosen aus, und das ist je nachdem ein Vortheil oder ein Nachtheil. Der

saure Alkohol darf nur selten mehr als $^1/_{1000}$ Säure enthalten, eher weniger.

Für den Anfänger gelte als ungefähre Richtschnur, dass man mit neutralem Alkohol auswäscht, wenn die ruhenden Kerne und die Mitosen gleich gut gefärbt werden sollen, während die anderen Methoden (§ 279) zur Differenzirung der Mitosen dienen.

Ueber die Länge der Zeit, die eine gute Differenzirung in Anspruch nimmt, lässt sich nur so viel sagen, dass sie in der Regel zwischen $^1/_2$ und 2 Minuten dauert; jedenfalls geht sie mit saurem Alkohol viel rascher vor sich als mit neutralem, ist daher auch riskanter.

Bei einigen der noch zu beschreibenden Methoden spielen Chromsäure und Jod eine Rolle. Ihre Wirksamkeit ist nicht genau bekannt; am wahrscheinlichsten ist es noch, dass die Chromsäure das Chromatin beizt und ihm so dabei hilft, die Farbe festzuhalten. Sie schlägt nämlich das Safranin nieder, und wenn sie nun eine besondere Verwandtschaft zum Chromatin haben sollte (besonders für das der Mitosen), so wäre die Erklärung vollständig. Auch das Jod scheint die Farbe zu fixiren (Genaueres s. unten bei Safranin und Gentianaviolett).

272. Substitution. Ausser der Differenzirung durch Alkohol giebt es die für die Praxis wichtige und zugleich theoretisch interessante Methode des Differenzirens mit Hülfe eines anderen Theerfarbstoffes. So werden z. B. Methylenblau und Gentianaviolett aus den Schnitten durch eine wässerige Lösung von Vesuvin oder Eosin entfernt, ebenso Fuchsin durch Methylenblau. Der zweite Farbstoff substituirt sich dem ersten in der Grundfarbe der Gewebe, und so bleiben, wenn alles in Ordnung verläuft, die Kerne mit dem ersten Farbstoff gefärbt, während der zweite als Kontrastfarbe wirkt.

Flemming differenzirt auf eine für einige Zwecke wichtige Art das Gentianaviolett mit Orange (s. seine Orange-Methode im § 301) und schreibt dies der „Säure" des Orange zu. Ich weiss nicht, wie weit die saure Natur im Ehrlichschen Sinne den Farbstoffen die Eigenschaft verleiht, die basischen oder weniger sauren Färbungen auszuziehen; jedenfalls besitzen diese Eigenschaft auch einige basische Farbstoffe, wie Vesuvin und Methylenblau (s. oben).

Resegotti (Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 320) konstatirt als allgemeine Regel, dass Farbstoffe, die regressiv keine Kernfärbung geben, die Farbstoffe auswaschen, die eine solche Färbung liefern. Die besten Resultate hat er in dieser Beziehung erhalten durch Färben mit Methylviolett oder Dahlia und Auswaschen mit Eosin oder Säurefuchsin, und zwar an Schnitten von Objekten, die in absolutem Alkohol fixirt waren. Indessen scheinen mir seine Experimente das doch nicht zu beweisen, was sie sollen. Denn er verwandte die zweite Farbe in Alkohol gelöst, und daher bleibt es unentschieden, wie weit dieser dabei mit im Spiel war. Dasselbe gilt übrigens von Bendas Safranin und Lichtgrün (§ 315).

273. Das Uebertragen in Balsam. Hat man die Differenzirung richtig beendet (s. § 271), so kann man das weitere Ausziehen des Farbstoffes durch Eintauchen der Schnitte in Wasser verhindern; gewöhnlich aber bringt man sie durch ein Vorharz in Balsam.

Als Vorharz kann man Nelkenöl nehmen, dass allerdings noch etwas Farbe auszieht. Oder ein Mittel, das die Farbe nicht angreift, wie Cedernöl, Bergamottöl, Xylol, Toluol; s. § 126. Hat man mit neutralem Alkohol differenzirt, so nimmt man am besten Nelkenöl, da jener nach sehr langer Färbung doch das Plasma nicht immer völlig entfärbt. Sonst jedoch, und nach saurem Alkohol braucht man es besser nicht, da es den Glanz der Farbe etwas schwächt. Aber es hilft die Mitosen differenziren, denn es entfärbt die ruhenden Kerne rascher als die sich theilenden. Uebrigens sind nicht alle Farbstoffe in dieser Beziehung gleich empfindlich, auch hängt viel von der Güte des so oft verfälschten Nelkenöls ab; frisches entfärbt rascher als altes.

Die aufgeklebten Schnitte übergiesst man einfach mit dem Vorharze. Hat es genug gewirkt, so ersetzt man es direkt durch Dammar oder Balsam; war es aber Nelkenöl, so muss man dieses zuvor durch Xylol, Cedernöl etc. entfernen, das die Farbe nicht angreift. Chloroform vermeide man stets nicht nur als Vorharz, sondern auch zum Verdünnen oder Lösen des Balsams.

274. Allgemeine Resultate. Die Resultate hangen sehr von der Vorbehandlung der Gewebe ab. Waren sie in Flemmings starkem Gemisch lange fixirt, nach dem Färben mit saurem Alkohol behandelt und mit Nelkenöl aufgehellt, so sind (mit einigen speziellen Ausnahmen) nur die Nucleoli und das Chromatin der Mitosen gefärbt, das der ruhenden Kerne aber nicht. Waren sie hingegen weniger fixirt, etwa mit dem schwachen Gemisch, und mit neutralem Alkohol differenzirt, so ist auch das ruhende Chromatin gefärbt.

275. Methode mit Kaliumhypermanganat nach Henneguy (Journ. Anat. Phys. Paris 27. Année 1891 p. 397). Sie basirt darauf, dass dieses Salz für manche Theerfarbstoffe als Beize wirkt und daher in Fällen, wo die gewöhnlichen Methoden versagen, eine gute Färbung herbeiführt.

Die Schnitte (Fixirung in Flemmings starkem Gemisch 2—6 Stunden lang, oder auch in Sublimat, Perényis oder Kleinenbergs Gemisch, Alkohol etc.) werden 5 Minuten lang mit einer 1%igen Lösung von Kaliumhypermanganat behandelt, dann mit Wasser gewaschen und mit Safranin, Rubin, Gentianaviolett, Vesuvin etc. gefärbt (nur halb so lange, wie man sie ohne Beize gefärbt hätte);

am besten nimmt man die Lösung von Safranin in Alkohol und Anilinwasser (§ 278). Darauf werden sie mit Alkohol differenzirt und wie gewöhnlich in Nelkenöl gebracht. Nun aber muss die weitere Entfärbung unter dem Mikroskope kontrolirt und im richtigen Augenblicke unterbrochen werden. Gewöhnlich geht sie langsam vor sich, und je langsamer, desto elektiver wird die Färbung. Häufig fährt sie noch fort, wenn die Schnitte schon in Balsam sind, besonders wenn das Nelkenöl vorher nicht ganz sorgfältig entfernt worden war, und so können die Präparate 24 oder 48 Stunden nach dem Einschliessen in Balsam besser sein als gleich zu Anfang.

Will man die Einzelheiten im Plasma besonders gut hervortreten sehen, so bringt man die Schnitte vor der Tinktion mit Safranin 10 Minuten lang in eine $^1/_2$ %ige Lösung von Hämatoxylin in 90 %igem Alkohol, wäscht sie mit Wasser aus, behandelt sie 10 Minuten lang mit einer 2 %igen wässerigen Lösung von Kaliumbichromat und wäscht sie wieder aus. Sind aber die Gewebe mit Flemmings Gemisch fixirt worden, so wird das kaum nöthig sein.

Das Kaliumhypermanganat beizt so energisch, dass, wenn man es zu lange hat einwirken lassen, bevor man mit Safranin (oder gar mit Rubin) färbt, sich die Schnitte überhaupt kaum noch gut entfärben; mitunter muss man sie dann Monate lang in Nelkenöl liegen lassen.

Henneguys Methode ist gewiss höchst erfolgreich, indessen glaube ich doch nicht, dass ihr Hauptwerth in der Plasmafärbung liegt, obwohl auch diese für manche Zwecke gut sein mag. Vielmehr halte ich sie für nützlich, insofern sie die zuweilen gar zu rasche Entfärbung der Schnitte verlangsamt.

276. Methode mit Formaldehyd nach Ohlmacher (Med. News 16. Februar 1895). Das Formaldehyd ist nach O. eine kräftige Beize für Theerfarbstoffe: entweder beizt man die Schnitte vorher in einer 2—4 %igen Lösung von Formalin (Deckglaspräparate 1 Minute lang) oder man verbindet das Beizen und Färben miteinander: zu 100 ccm 4 %igem Formalin setzt man entweder 1 g Fuchsin und 10 ccm absol. Alkohol oder 10 Theile einer gesättigten alkohol. Lösung von Gentianaviolett oder von Methylviolett 5 B; oder in den 100 ccm löst man 1 g Methylenblau auf. Die Schnitte färbt man darin $^1/_2$ Minute lang, und sie sollen dann dem Alkohol viel besser widerstehen, als wenn sie wie gewöhnlich gefärbt wären. Die entsprechende Lösung von Safranin O (von Grübler) soll genau dieselbe Plasmafärbung geben wie Eosin.

277. Wahl der Farbstoffe. Die Kernfarbstoffe sind so zahlreich, dass man glauben möchte, man käme bei der Auswahl in Verlegenheit. Für allgemeine Zwecke könnte man sich auch wohl an einem guten rothen und einem guten blauen genügen lassen, z. B. an Safranin und Thionin oder Gentianaviolett. Indessen für feinere Arbeiten ist es doch wohl erwünscht, noch eine oder zwei mehr zu haben, denn man muss auch die Art in Betracht ziehen, wie sich diese Farbstoffe bei der doch erwünschten Kombination mit Plasmafarbstoffen verhalten. Ferner geben einige Kernfarbstoffe eine etwas trübe Tinktion, sodass die

Chromosomen und Nucleoli häufig ganz undurchsichtig erscheinen. Dies gilt z. B. von Gentianaviolett, nicht aber von Dahlia, das jenem sonst im Ton nahe kommt. Andererseits lassen Safranin und Methylgrün die Zellelemente ganz durchsichtig. Das ist bei dicken Schnitten und zuweilen auch sonst ein Vortheil, nur begünstigt diese Transparenz leider die Bildung von Diffraktionslinien, die bei feineren Arbeiten einer guten optischen Definition hinderlich werden können. Mithin gewähren die trüben Farben, z. B. Gentianaviolett, bei sehr dünnen Schnitten, und wenn es auf sehr genaue Definition des Chromatins ankommt, doch wieder einen Vortheil, während die transparenten oder halbtransparenten Farben, z. B. Safranin, sich besser für dicke Schnitte eignen. Auch kommt es mir so vor, als wenn die blauen Farben, wie Gentianaviolett, für Untersuchungen bei künstlichem Lichte nicht recht vortheilhaft sind: sie geben mehr oder weniger dichroitische Bilder, die einer guten Definition im Wege stehen.

In Summa möchte ich also Safranin als rothen, Thionin oder Gentianaviolett als blauen Kernfarbstoff empfehlen, es sei denn, dass spezielle Bedingungen (s. oben) eine andere Wahl anrathen.

---

14. Kapitel.

Färben der Kerne mit Theerfarbstoffen.

A. Regressive Färbung.

278. Safranin. Es ist einer der wichtigsten Farbstoffe, nicht nur, weil es sehr stark, feurig und dauerhaft färbt, sondern weil es sich auch den Kernen und den anderen Elementen der Gewebe gegenüber sehr verschieden verhält.

Das ganze Geheimniss beim Färben mit Safranin ist, ein gutes Safranin zu bekommen, und es sei daher hier dringend auf die Bemerkungen in § 216 verwiesen. Bevor man also sich überhaupt auf das Färben mit Safranin einlässt, verschreibe man sich von Grübler & Hollborn oder Münder genau die Sorte, die man braucht, gebe demnach an, ob man damit Kerne oder elastische Fasern färben, oder wozu man es sonst brauchen will.

Es giebt wohl wenigstens 20 Sorten von Safranin zu kaufen, und sie unterscheiden sich beträchtlich in Farbe, Gewicht, Löslichkeit und Wirkung. Einige sind leicht löslich in Wasser, nicht aber in Alkohol, andere genau umgekehrt, wieder andere in beiden. Resegotti (Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 320) hat 14 Sorten, die ihm Grübler und Münder lieferten, untersucht: alle ergaben ihm positive Resultate mit Chromsäure (s. unten p. 170), obwohl Grübler angegeben hatte, dass die Marken XX, XXBN und TB das nicht thäten (nach den gewöhnlichen Methoden), aber die besten waren doch jene drei, ferner „Safranin wasserlöslich,“ „Safr. spirituslöslich“ (alle von Grübler) sowie von Münder die Marken Rein, O, FJJ und Conc.

Seit langer Zeit benutze ich mit gutem Erfolge Grüblers Safranin O. Man vergesse aber nicht, dass bei den ständig sich ändernden Fabrikationsmethoden auch die Eigenschaften der Produkte von Zeit zu Zeit etwas variiren müssen.

Die meisten Safranine sind nicht genug in Wasser löslich, man muss daher andere Mittel zur Lösung anwenden. Pfitzner (Morph. Jahrb. 6. Bd. 1880 p. 478; 7. Bd. 1882 p. 291) löst 1 Theil Safranin

in 100 Theilen absol. Alkohol und setzt nach einigen Tagen 200 Theile dest. Wasser hinzu. Flemming (Arch. Mikr. Anat. 19. Bd. 1881 p. 317) benutzt eine konzentrirte Lösung in absol. Alkohol, die er aber mit etwa halb so viel Wasser verdünnt hat. Babes (Arch. Mikr. Anat. 22. Bd. 1883 p. 356) verwendet ein Gemisch von gleichen Theilen einer konzentrirten wässerigen und konzentrirten alkoholischen Lösung (sehr zu empfehlen) sowie eine konzentrirte oder übersättigte wässerige Lösung, die in der Wärme gemacht und bei 60° filtrirt worden ist, mithin auch warm benutzt wird, da sie in der Kälte Kristalle ausscheidet. Auch rein wässerige Lösungen sind noch in Gebrauch. Endlich löst Babes (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 470) Safranin (im Ueberschuss) in 2 Theilen Anilin und 100 Theilen Wasser; dies Gemisch muss auf 60—80° erwärmt und durch ein benetztes Filter filtrirt werden, es hält sich 1—2 Monate lang. Zwaardemaker (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 212) mischt etwa gleiche Theile einer konzentrirten alkoholischen Lösung von Safranin mit Anilinwasser (dies wird durch Schütteln von Wasser mit Anilin und Filtriren gewonnen); nach meiner Erfahrung hält es sich viele Monate, vielleicht für immer. Ich selber benutze gewöhnlich gleiche Theile einer konzentrirten Lösung in Alkohol und einer solchen in Anilinwasser.

Alle genannten Gemische können nach irgend einer der gleich anzugebenden Methoden differenzirt werden, natürlich muss man aber mit den schwächeren länger färben. Ueber das Anilin dabei s. § 270.

Allgemeines über das Differenziren s. im § 271 und 273. In Anwendung kommt entweder die Methode mit neutralem oder die mit saurem Alkohol (Flemming in: Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 350, und in: Arch. Mikr. Anat. 37. Bd. 1891 p. 249), je nachdem alles Chromatin oder nur das in den Mitosen gefärbt werden soll. Alkohol mit $^1/_{1000}$ Salzsäure ist dazu am besten. Die Voraussetzung dabei ist, dass die Objekte wenigstens 12 Stunden lang in Flemmings starkem Gemisch fixirt und einige Stunden lang gefärbt worden sind. Podwyssozki (Beitr. Path. Anat. Ziegler 1. Bd. 1886; Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 405) färbt nur $^1/_2$ Stunde lang, giebt aber noch eine andere Methode zum Differenziren an: die Schnitte kommen aus der Farbe auf einige Sekunden bis 2 Minuten in eine starke alkoholische Lösung von Pikrinsäure und dann in reinen Alkohol; die Farbe wird aber braun statt rein roth. Babes empfiehlt nach der Färbung in Anilinwasser die Behandlung mit Jod nach Gram (§ 279); dasselbe thut Prenant (Internation.

Monatschr. Anat. Phys. 4. Bd. 1887 p. 368), meint aber, man müsse die Jodlösung etwas länger, den Alkohol etwas kürzer einwirken lassen als bei Gentianaviolett.

Martinotti & Resegotti (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 328) differenziren mit einem frischen Gemisch von 1 Theil einer $^1/_{10}$%igen wässerigen Chromsäure und 9 Theilen absolutem Alkohol, darauf mit reinem Alkohol und Bergamottöl. Nach meinen Erfahrungen taugt diese Methode wohl weniger, jedenfalls nicht mehr, als die von Bizzozero (§ 279), die sehr nützlich ist. Allerdings haben es M. & R. nur mit schwach gefärbtem Materiale aus Alkohol zu thun, nicht mit solchem aus Flemmings Gemisch, und das ist ein grosser Unterschied.

Garbini (Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 170) entwässert die Schnitte nach dem Färben in Methylalkohol, der Safranin nur sehr wenig löst, und differenzirt sie dann in einem Gemisch von Nelkenöl (2 Theile) und Cedernöl (1 Theil). Mir hat diese Methode keine guten Resultate ergeben.

Ohlmacher (Journ. Amer. Med. Ass. Vol. 20 1893 p. 111) macht darauf aufmerksam, dass bei Behandlung der mit Safranin gefärbten Schnitte mit Jod oder Pikrinsäure in den Geweben Präcipitate auftreten können, die Aehnlichkeit mit den Coccidien etc. des Krebses haben, und warnt daher besonders die Pathologen.

Ueber Differenziren durch Substitution s. oben § 272, über Safranin zum Färben von Schleim § 809.

279. Gentianaviolett. Ebenfalls sehr wichtig. Man braucht es in wässeriger oder in alkoholischer, mit etwa halb so viel Wasser verdünnter Lösung (Flemming, Zellsubstanz 1882 p. 384) und differenzirt mit neutralem oder mit angesäuertem (Flemming in: Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 350) Alkohol, wie beim Safranin.

Eine andere, allerdings sehr umständliche Methode giebt Bizzozero (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 24) an. Die Gewebe werden entweder in Alkohol oder in einem Chromgemisch konservirt, müssen aber im letzteren Fall mit Wasser gut ausgewaschen werden. Das Färbgemisch (es ist das von Ehrlich für Bakterien) besteht aus Gentianaviolett 1 Theil, Alkohol 15, Anilin 3 und Wasser 80 Theilen. Die Schnitte werden darin 5—10 Minuten (oder auch länger, bei Material aus Flemmings Gemisch braucht man oft 5—10 Stunden) gefärbt, mit Alkohol abgespült, dann in eine $^1/_{10}$%ige wässerige Chromsäure und nach 30—40 Sekunden wieder in den Alkohol gebracht, der die Farbe allmählich auszieht. Nun kommen sie nochmals auf 30 Sekunden in Chromsäure, damit die Farbe in den Mitosen besser fixirt werde; nochmals auf 30—40 Sekunden in den Alkohol zum Entwässern, endlich in Nelkenöl, das noch mehr Farbe auszieht und daher bald

gewechselt werden muss; in dem zweiten Nelkenöl lässt man die Schnitte so lange, wie sie noch Farbe abgeben, und schliesst sie dann in Dammar ein.

Man darf auch den Alkohol länger und das Nelkenöl kürzer wirken lassen, erhält dann aber ein etwas anderes Resultat: der Alkohol wäscht die Farbe aus allen Kernen leicht aus, während Nelkenöl energischer auf die ruhenden als auf die sich theilenden wirkt, also letzere hervorheben hilft.

In einigen Fällen, besonders wenn die Kerne die Farbe zu leicht abgeben, fährt man besser bei der Kombination dieser Methode mit der von Gram (Fortschr. Med. 2. Bd. 1884 No. 6). Gram nämlich behandelt die gefärbten Schnitte mit einer Lösung von 1 g Jod und 2 g Jodkalium in 300 ccm Wasser. Bizzozero verfährt nun wie folgt: er färbt mit Gentianaviolett, wäscht 5 Sekunden in Alkohol, 2 Minuten in der Gramschen Lösung, 20 Sekunden in Alkohol, 30 Sekunden in der Chromsäure, 15 in Alkohol, wieder 30 in der Chromsäure und 30 in Alkohol, endlich entfärbt er in öfter gewechseltem Nelkenöl. Nissen (Arch. Mikr. Anat. 26. Bd. 1886 p. 338) macht es gerade so, lässt aber die Chromsäure fort.

Das ausserordentlich starke Gentianaviolett wirkt genau so scharf wie das Safranin und ist ihm vielleicht noch für manche Untersuchungen an sehr dünnen Schnitten vorzuziehen (dicke werden wegen der vielen Kerne leicht zu dunkel). Auch eignet es sich gut zu Doppelfärbungen mit rothen oder gelben Plasmafarbstoffen.

Die Farbe hält sich recht gut in Dammar, allerdings nicht so gut wie das Safranin. Flemming (Zellsubstanz p. 384) fand seine Präparate nach einem Jahre ein wenig verblasst; meine eigenen haben sich in Terpentinöl-Kolophonium viele Jahre lang gehalten, wenn sie nicht übermässig dem Lichte ausgesetzt wurden.

Das Gentianaviolett färbt in saurer Lösung die Kerne in frischen Geweben und ist auch mit indifferenten Medien zuweilen zum Färben intra vitam (§ 213) recht nützlich.

280. Thionin. Das Thionin oder Lauths Violett steht chemisch dem Methylenblau nahe. Es scheint für die Industrie nicht mehr dargestellt zu werden, ist aber von Grübler & Hollborn zu beziehen. Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p. 314) hat es auch von Klönne & Müller in Berlin und von E. Merck in Darmstadt erhalten. Hoyer führte es als das beste Mittel zum Färben des Schleimes (§ 809) in die Technik ein, während M. Heidenhain (Arch. Mikr. Anat. 43. Bd. 1894 p. 433) es warm für die Kerne empfahl. Ich kann Heidenhain nur beipflichten:

Thionin liefert wohl die schönsten Kernfärbungen, die ich je gesehen habe. Ich bringe es hier bei den regressiven Färbmitteln unter, indessen färbt es von vornherein so elektiv, dass man es fast zu den progressiven rechnen könnte. Färbt man nämlich mit seiner konzentrirten wässerigen Lösung einige Minuten lang, so wird kaum etwas ausser dem Chromatin tingirt sein (erst später nimmt auch das Plasma Farbe an); man braucht daher die Präparate nicht zu differenziren, sondern nur mit Wasser abzuspülen, zu entwässern und in Balsam einzuschliessen. Hat man dagegen stark tingirt, so differenzirt man wie gewöhnlich mit Alkohol; gegen diesen aber ist die Farbe so widerstandsfähig, dass man dabei gar nicht über das Ziel hinausschiessen kann: in einer Stunde zieht nicht mehr aus, als von Gentianaviolett oder Dahlia in einer Minute, mithin lässt sich der Prozess unter dem Mikroskope bequem kontroliren. Deshalb eignet sich, scheint mir, das Thionin besonders für Anfänger. Es färbt sehr stark sowohl Präparate aus Sublimat als auch aus Flemmings Gemisch, definirt gut und scheint sich gut zu halten.

Marchoux (Ann. Inst. Pasteur 1897) empfiehlt sehr das Thionine phéniquée de Nicolle, nämlich ein Gemisch von 1 Theil einer konzentrirten Lösung von Thionin in 50%igem Alkohol und 5 Theilen einer 2%igen wässerigen Karbolsäure. Letztere gehe darin eine chemische Verbindung mit dem Thionin ein, und daher sei die Lösung erst in einigen Tagen gut.

Henneguy (in litt.) hat sehr gute Resultate erhalten, indem er gefärbte Objekte mit Aceton entwässert; da aber das Differenziren mit Alkohol so leicht geht, so wird man wohl nur in besonderen Fällen zum Aceton greifen. — Ueber eine Doppelfärbung mit Thionin und Pikrinsäure s. Sabrazès (C. R. Soc. Biol. Paris (10) Tome 4 1897 p. 51), mit Thionin und Rutheniumroth s. Eisen (Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 200).

281. Von anderen regressiven Farben seien noch erwähnt

Dahlia nach Flemming (Arch. Mikr. Anat. 19. Bd. 1881 p. 324). Färbt die Kerne blasser als Gentianaviolett oder Safranin, hebt aber die Körner im Plasma gewisser Zellen scharf hervor.

Dahlia ist auch für frische Gewebe ein guter Kernfarbstoff (Ehrlich in: Arch. Mikr. Anat. 13. Bd. 1876 p. 263): die wässerige Lösung wird mit 5% Essigsäure versetzt, oder man färbt mit der neutralen Lösung und wäscht mit angesäuertem Wasser aus; Einschluss nach dem Entwässern in Terpentinöl-Kolophonium. Es ist auch nützlich zum Färben intra vitam (§ 213).

Viktoriablau nach Lustgarten (Med. Jahrb. Ges. Aerzte Wien 1886 p. 285). Ich finde, es färbt sehr gut, namentlich wenn die Schnitte

vorher einige Minuten mit Jodtinktur behandelt worden sind. Es hat eine spezielle Neigung zu den elastischen Fasern; um sie zu färben, nimmt Lustgarten eine alkoholische Lösung, die mit dem 2—4 fachen an Wasser verdünnt ist. Ich glaube aber, die Gewebe müssen vorher in einem Chromosmium- oder wenigstens in einem Chromgemisch fixirt sein und lange gefärbt werden. Auch den Schleim färbt das Blau stark, und Alkohol zieht die Farbe nicht aus.

Flemming (Arch. Mikr. Anat. 19. Bd. 1881 p. 323) erwähnt unter anderem auch folgender Farbstoffe:

Magdalaroth (Naphthalinroth, Rose de Naphtaline.) Beinahe oder vielleicht gerade so gut wie die vorgenannten und an Haltbarkeit allen überlegen, nur nicht dem Safranin.

Fuchsin (verschiedene Salze des Rosanilins, im Handel bekannt als Fuchsin, Anilinroth, Roseïn, Magenta, Solferino, Neufuchsin, Parafuchsin etc.). Ein guter aber schwacher Farbstoff. Gute Resultate soll er in folgender Weise liefern (Graser in: D. Zeit. Chir. 27. Bd. 1888 p. 538; Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 378): entweder verfährt man wie mit Methylviolett (§ 285) oder man färbt 12—24 Stunden mit einer schwachen wässerigen Lösung, wäscht kurz mit Alkohol, färbt einige Minuten mit einer wässerigen Lösung von Methylenblau und entwässert. Chromatin und Kernkörperchen roth, der Rest blau.

Karbolfuchsin nach Ziehl ist als dem Safranin überlegen 1890 von Schenck in einer Dissertation empfohlen worden (s. Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 39). Man löst 1 g Fuchsin in 100 ccm Wasser, 10 ccm Alkohol und 5 ccm Karbolsäure (oder giebt zu einer 5%igen wässerigen Lösung von Karbolsäure soviel von einer konzentrirten alkoholischen Lösung von Fuchsin, bis sich an der Oberfläche eine Haut mit Metallglanz ausscheidet). Nach dem Färben wird mit Alkohol, dann mit Nelkenöl ausgewaschen.

Orange färbt zwar nicht diffus, aber viel schwächer als die übrigen.

Bismarckbraun taugt für Material aus Chromsäuregemischen nicht viel, giebt dagegen mit Material aus Alkohol gute Kernfärbungen, nur lässt es sich freilich aus dem Plasma gar nicht ordentlich auswaschen. Dagegen kann es mit Vortheil znm Durchfärben dienen, weil es dem Alkohol zur Genüge widersteht. Kaiser (Bibl. Z. 7. Heft 1891; Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 363) hat gute Erfolge damit erzielt. Er färbt 48 Stunden bei 60° C. mit einer konzentrirten Lösung von Bismarckbraun in 60%igem Alkohol (er bereitet sie durch Kochen) und wäscht in 60%igem Alkohol mit 2% Salzsäure oder 3% Essigsäure aus, bis nur noch die Mitosen gefärbt bleiben.

Methylviolett, vielleicht am besten nach Martinotti & Resegotti (§ 278) zu brauchen.

Benzoazurin ist von Zschokke (Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 468) und von Martin (ibid. 6. Bd. 1889 p. 193) empfohlen worden. Man färbt die Celloidinschnitte etwa 1 Stunde lang in schwacher wässeriger Lösung und wäscht mit Salzsäure - Alkohol aus.

Auch **Methylenblau** kann regressiv zum Kernfärben benutzt werden.

Mit **Nigrosin** nach Errera (Proc. Verb. Soc. Belge Micr. 1881 p. 134) habe ich gute starke Kernfärbungen erhalten. Dem Alkohol widersteht es gut. Auch mit **Toluidinblau** habe ich die Kerne prächtig gefärbt, leider aber war das Plasma diffus gefärbt. Mann (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 489) benutzt es mit gutem Erfolge nach Eosin, das dabei zur Färbung des Plasmas dient.

B. Progressive Färbung.

282. Allgemeines. Der Leser möge sich merken, dass viele oder gar die meisten Theerfarbstoffe die Kerne mehr oder weniger rein tingiren, wenn die Lösungen mit Essigsäure vermischt werden. Hier jedoch sollen nur die besprochen werden, die in jeder Beziehung, sowohl in Präzision und Haltbarkeit als auch in Einfachheit bei der Anwendung u. s. w., eine wirklich werthvolle Färbung liefern. Das sind in erster Linie Methylgrün und Bismarckbraun, während die übrigen, allenfalls Methylviolett ausgenommen, wohl übergangen werden dürfen (s. aber wegen des Thionins § 280).

283. Methylgrün. Dies ist im Handel das gewöhnlichste von allen Anilingrünen. Synonyma davon scheinen zu sein Methylanilin, Grünpulver, Vert lumière und Lichtgrün, jedoch sind die beiden letzteren eigentlich die Namen eines anderen Farbstoffes (§ 315). Als Calberla (Morph. Jahrb. 3. Bd. 1877 p. 625) es einführte, kannte man es als Vert en cristaux. Auch geht es im Handel gewöhnlich unter dem Namen theuerer Grüne, besonders des Jodgrüns, jedoch darf es damit nicht verwechselt werden, auch nicht mit dem Aldehydgrün (Vert d'Usèbe), dem Parisergrün und dem Alkaligrün oder Viridin.

Methylgrün entsteht durch die Einwirkung von Chlormethyl auf Methylviolett und enthält daher immer noch etwas unzersetztes Violett, soll auch zuweilen mit Anilinblau oder mit einem grünen Nebenprodukt verfälscht werden. Es ist äusserst empfindlich gegen Alkali, und daher darf man es nur in sauren Lösungen anwenden und zum Auswaschen und Einschliessen nur saure oder wenigstens ganz neutrale Medien gebrauchen.

Nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p. 312) ist das Violett leicht durch Ausschütteln der wässerigen Lösung mit Chloroform zu ermitteln. Noch bequemer, wenn auch nicht so empfindlich, ist folgende Probe: man bringt einen Tropfen der Lösung auf Filtrirpapier und hält den grünen Fleck über eine offene Flasche mit Ammoniak: er darf nicht violett werden, sondern muss verschwinden.

Es ist ein äusserst wichtiges Reagens. Hauptsächlich dient es zum Färben der Kerne von frischen oder soeben erst fixirten Geweben. Hierzu verwendet man es in starker wässeriger

Lösung unter Zusatz von etwa 1 % Essigsäure. Man wäscht mit Wasser aus, am besten mit angesäuertem, und schliesst in einem ebenfalls angesäuerten wässerigen Medium ein, das etwas Methylgrün gelöst enthält (s. unten).

Bei dieser Art der Anwendung ist das Methylgrün ein reiner Kernfarbstoff, d. h. es ist ein scharfes Farbreagens auf Chromatin. Denn im Kern färbt es nur das Chromatin, nicht auch seine übrigen Bestandtheile, und ausserhalb des Kerns färbt es nur einige Arten Zellplasma und geformte Bestandtheile, besonders Sekrete von Drüsen (z. B. Seide und Schleim). Aber das Chromatin wird unweigerlich hellgrün (Ausnahme das Nucleïn im Kopfe einiger Arten Sperma), während die anderen Elemente gewöhnlich blau oder violett werden, vielleicht weil sie die Beimischungen des Methylgrüns in sich aufnehmen.

Burckhardt (La Cellule Tome 12 1897 p. 364) macht darauf aufmerksam, dass Methylgrün mit Essigsäure zwar in den frischen Kernen das Chromatin gut färbe, nicht aber, wenn diese vorher mit Essigsäure fixirt seien. (Für Bismarckbraun gelte dasselbe.) Und während nach Fixirung mit reiner Sublimatlösung das Methylgrün das Chromatin sicher färbe, versage es, wenn man Sublimat mit Essigsäure angewandt habe.

Ferner färbt das Methylgrün augenblicklich und überfärbt nie; die Lösung dringt gut ein, tödtet die Zellen sofort, ohne sie zu schwellen oder sonst in der Form zu verändern, und erhält sie so wenigstens einige Stunden, darf daher als ein zartes Fixirmittel gelten. Auch lässt es sich, ohne auszufallen, mit mehreren Fixir- oder Konservirmitteln mischen, so mit $^1/_{10}$—1 % Osmiumsäure oder mit dem Gemisch von Ripart & Petit (§ 74), das sich übrigens auch gut zum Auswaschen und Einschliessen eignet.

Alkoholische Lösungen dienen ebenfalls zum Färben, müssen aber gleichfalls mit Essigsäure versetzt sein.

Böhm & Oppel (Taschenbuch 3. Aufl. 1896 p. 69) färben die Schnitte 10 Minuten lang mit einer Lösung von 1 Theil Methylgrün in 100 Theilen Wasser und 25 Theile absol. Alkohol oder 24 Stunden lang in obiger Lösung, die mit 20 %igem Alkohol auf wenigstens das doppelte Volum verdünnt ist.

Die Farbe hält sich nicht gut. Es ist schwer, die Präparate befriedigend in Balsam zu bringen, denn der Alkohol zieht die Farbe aus, falls er nicht selber ordentlich damit versehen wird; jedoch kann man dem einigermaassen abhelfen (wenigstens wenn man das Methylgrün im Biondischen Gemisch verwendet), indem man nach M. Heidenhain die Schnitte vor dem Färben einige Minuten lang mit Jodtinktur

behandelt (§ 306). Squire (Methods p. 38) sagt, tüchtiges Auswaschen mit Wasser nach dem Färben habe dieselbe Wirkung. Von den Präparaten, die man in den gebräuchlichen wässerigen Medien mit Ueberschuss an Farbstoff aufhebt, halten sich die besten auch nur wenige Monate. Nach brieflicher Mittheilung von Henneguy jedoch bleiben sie in Bruns Gemisch (§ 420) gut.

Ohne Zweifel ist Methylgrün eins der besten Färbmittel. Es ist der klassische Kernfarbstoff für frische Gewebe.

284. Bismarckbraun (Manchesterbraun, Phenylenbraun, Vesuvin). Ein ziemlich reiner Kernfarbstoff, sowohl für frische Gewebe als auch für die mit Chromsäure gehärteten.

Der Farbstoff ist in Wasser nicht sehr leicht löslich. Man koche ihn entweder damit und filtrire nach 1—2 Tagen (Weigert in: Arch. Mikr. Anat. 15. Bd. 1878 p. 258), kann auch der Lösung etwas Essigsäure oder Osmiumsäure zusetzen. Mayzel (ibid. 18. Bd. 1880 p. 237) löst ihn in Essigsäure (gibt keine haltbare Farbe). Auch alkoholische Lösungen sind brauchbar (z. B. konz. wäss. Lösung mit $^1/_3$ Vol. Alkohol von 90 % versetzt), und sehr gut zum Lösen ist Calberlas Gemisch von Glycerin und Alkohol (§ 424) oder verdünntes Glycerin (40—50 %). Die wässerigen Lösungen müssen oft filtrirt werden; empfohlen hat man auch den Zusatz von Karbolsäure.

Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p. 315) verwendet zum Färben eine wässerige Lösung von 0,05 g in 100 ccm destill. Wasser, warnt aber vor dem öfteren Filtriren, da das Papier stets viel Farbe zurückhalte, wie dies nach Schiefferdecker (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 43) mit Methylgrün und Anilingrün der Fall sei.

Bismarckbraun färbt sehr rasch und überfärbt nie; die Farbe ist in Balsam und Glycerin haltbar. Hauptsächlich dient es zum Färben von Stücken in toto, aber man kann es auch regressiv für Schnitte benutzen (oben p. 173), ferner für die Färbung intra vitam (§ 213), dann natürlich aber nur in ganz neutraler Lösung.

285. Methylviolett (Methylanilin, Anilinviolett, Pariser Violett). Graser (D. Zeit. Chir. 27. Bd. 1888 p. 538; Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 378) färbt die Schnitte von Material aus Chromosmiumessigsäure 12—24 Stunden lang mit einer wässerigen Lösung, die so schwach ist, dass am Ende dieser Zeit die Schnitte die ganze Farbe an sich gerissen haben. Dann wäscht er sie kurze Zeit mit angesäuertem, darauf mit reinem absolutem Alkohol (und bringt sie wohl endlich in Balsam). Schiefferdecker sagt in seinem Referate, wonach ich berichte, die Kerne färbten sich sogar noch besser als mit Safranin.

Frische Gewebe kann man mit Methylviolett in schwacher Essigsäure, wie § 281 für Dahlia angegeben, gut färben.

15. Kapitel.

Färben mit Methylenblau.

286. Methylenblau ist das Chlorhydrat oder das Zinkchlorid-Doppelsalz des Tetramethylthionins und in Ehrlichs Sinne ein basischer Farbstoff. Man scheint es hie und da mit Methylblau verwechselt zu haben, das aber gar nichts mit ihm zu thun hat. Das Methylenblau des Handels enthält zuweilen etwas Methylenroth. Das ist aber durchaus nicht unerwünscht, im Gegentheil, es liefert mitunter Differenzirung in Zellen oder Geweben, die sich sonst nicht erzielen lassen. Immerhin kommt eine solche Beimengung aber nicht mehr so oft vor wie früher. In diese Kategorie gehört auch Unnas polychromes Methylenblau (bei Grübler & Hollborn zu haben), das zum Färben von Zellkörnelungen dient (§ 787).

Dagegen muss das Blau zum Färben der Nerven intra vitam so rein wie möglich sein. Nach Apáthy (Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1893 p. 466) eignet sich hierzu am besten — jedenfalls wenn man genau seine Resultate (§ 292) erzielen will, nur dieses — das von E. Merck in Darmstadt; es steht in dessen Preisliste als medizinisches Methylenblau und auf der Etikette als: Anilinblau, Methylen, chemisch rein und chlorzinkfrei. Bestellt man sich also Methylenblau, so sollte man genau angeben, wozu man es benutzen will.

287. Anwendungen des Methylenblaus. Es scheint auf dem besten Wege zu sein, eins der wichtigsten Färbmittel für den Histologen zu werden. (Den Pathologen ist es bestens bekannt als solches für Mikroorganismen in den Geweben.) Man braucht es zur spezifischen Tinktion markhaltiger Nervenfasern auf Schnitten und von Plasmazellen. Ferner kann man mit ihm gewisse andere Theerfarbstoffe auswaschen und erhält dabei Doppelfärbungen. Auch färbt es allerlei lebende Gewebe ganz oder beinahe ohne Beeinträchtigung ihrer vitalen Funktionen. Endlich aber liefert es Färbungen des Nervensystems, der intercellulären

Kittsubstanzen, Lymphbahnen etc., und von diesen heisst es, sie seien im Wesentlichen denen gleich, die eine gut gelungene Imprägnation mit Gold oder Silber aufweist, aber viel leichter und sicherer zu erzielen als diese. Indessen ist das nicht ganz der Fall: Gold imprägnirt viele nervöse Elemente zugleich, mitunter alle, während Methylenblau nur verhältnissmässig wenige färbt, diese aber dafür um so schärfer hervorhebt, sodass sie sich auf weite Strecken verfolgen lassen. Hiernach verhält sich das Methylenblau mehr wie nach Golgis Methode Chromsäure und Silber (s. § 738).

288. Färbung ganzer Thiere intra vitam. Kleine, gut durchlässige Wasserthiere kann man lebendig färben, indem man zum Wasser soviel Methylenblau setzt, dass es nur ganz schwach blau wird. Sind die Thiere durchsichtig, so lassen sie sich ohne Weiteres jederzeit unter dem Mikroskop beobachten, und es zeigt sich dann, dass nach einiger Zeit manche Gewebe den Farbstoff aufgenommen haben, andere nicht. Setzt man die Thiere nun wieder in das Wasser zurück und wartet lange genug, so findet man auch andere Gewebe gefärbt. So sah Ehrlich, dem diese Methode in ihren Prinzipien zu verdanken ist (Biol. Centralbl. 6. Bd. 1886 p. 214), dass nach der Injektion von Methylenblau in lebende Thiere die Axencylinder der sensorischen Nerven gefärbt wurden, die der motorischen hingegen nicht (diese kommen nämlich erst später an die Reihe). Man könnte nun glauben, bei längerer Dauer der Selbstfärbung würden zuletzt alle Gewebe gefärbt werden. Dem ist jedoch nicht so: stets bleiben sie auf dem Maximum der Tinktion nur kurze Zeit stehen und geben dann den Farbstoff noch rascher ab, als sie ihn aufgenommen haben; und so ereignet es sich sehr oft, dass die sich zuerst färbenden Elemente ihre Farbe schon beinahe oder ganz wieder eingebüsst haben, wenn die späteren gerade das Maximum erreichen. Ja, ich habe sogar gesehen, dass alle färbbaren Gewebe die ganze Tonleiter der Färbung und Entfärbung durchmachten, bis das Thier wieder genau so farblos war wie zu Anfang, und all dies ohne anscheinende Veränderung in seiner Lebensthätigkeit. Daher ist diese vorübergehende Färbung nicht echt (s. § 213).

Hieraus ergiebt sich, dass unter diesen Bedingungen zwar die Totalfärbung eines Thieres kaum erzielt werden kann, wohl aber eine spezifische Färbung einer oder der anderen Gruppe von Geweben sich auf zwei Wegen erreichen lässt: 1) färbt sich das gewünschte Gewebe früher als die anderen, so kann man es studiren, wenn es allein intensiv genug tingirt ist, während die übrigen noch nicht so weit sind; färbt es sich dagegen später, so wartet man, bis die übrigen sich schon wieder genügend entfärbt haben; 2) man fixirt die Farbe in einem dieser Stadien und macht sich Präparate (§ 293), um sie in Ruhe zu studiren. (Siehe auch die Notizen von Pilliet in: C. R. Soc. Biol. Paris (10) Tome 4 1897 p. 886.)

Die richtige Stärke der jedenfalls sehr schwachen Lösungen muss man für jedes Objekt erst ausprobiren. In der Praxis wird wohl der Farbenton den richtigen Führer bilden, ist man aber im Zweifel, so nehme man 1:100000 und

verstärke oder schwäche je nach Bedürfniss. Nach Zoja (Rend. Istit. Lombardo Milano Vol. 25 1892; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 208) eignet sich für *Hydra* 1:20000 bis 1:10000.

Die Färbung ist etwas launenhaft. Ohne Probe lässt sich nicht sagen, welche Gewebe sich zuerst färben werden. Uebrigens dringt der Farbstoff sehr schlecht ein, und dies erklärt vielleicht hauptsächlich die anscheinende Launenhaftigkeit und bestimmt zugleich wesentlich die Reihenfolge, worin die Gewebe sich färben. In der Regel färben sich die Drüsenzellen früh, dann ohne bestimmbare Ordnung andere Epithelzellen, Fettzellen, Plasmazellen, Mastzellen, Blut- nnd Lymphzellen, elastische Fasern, glatte Muskeln, quergestreifte Muskeln. Auch giebt es Elemente, die sich zwar im Leben färben, aber nicht, wenn man, wie oben angegeben, die ganzen Thiere unversehrt in die schwache Lösung bringt. Dies sind in erster Linie die Nervenfasern und Ganglienzellen: sie färben sich dann gar nicht, höchst wahrscheinlich einfach deshalb, weil die Farbe nicht bis zu ihnen hindringt.

289. Färben des Nervengewebes intra vitam. Wie oben angegeben, erhielt Ehrlich durch Injiziren einer Lösung von Methylenblau in die Gefässe oder Gewebe lebender Thiere die Axencylinder der Nervenfasern spezifisch gefärbt. Er glaubte, und mit ihm die meisten Forscher, diese Färbung sei das Produkt einer vitalen Reaktion der Gewebe und könne an todtem Material nicht erzielt werden. Von dem Standpunkte jedoch, der oben in § 213 eingenommen wird, scheint das Gegentheil richtig zu sein. Natürlich ist die Färbung insofern eine Erscheinung intra vitam, als sie im lebenden Organismus vor sich geht, aber ich halte doch dafür, dass die Gewebe selber die Farbe erst dann annehmen, wenn sie todt oder wenigstens am Absterben sind.

Wie gesagt, glaubte man früher, an todtem Material lasse sich die Reaktion nicht erzielen. Indessen sah Dogiel (Arch. Mikr. Anat. 35. Bd. 1890 p. 305 ff.) die Nerven in den Beinmuskeln des Frosches sich noch 3—8 Tage, nachdem die Beine abgeschnitten worden waren, färben. Er meint nun, die Reaktion beweise, dass die Nerven dann noch lebendig gewesen seien. Jedoch wird man richtiger mit Apáthy (Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 15 ff.) daraus folgern, dass sich die Nerven auch nach dem Aufhören des Lebens noch färben. Apáthy hat direkte Versuche hierüber gemacht und stellt die Bedingungen dafür folgendermaassen zusammen: das Gewebe braucht nicht mehr zu leben, muss aber noch frisch sein; nichts darf daraus auf chemischem Wege extrahirt, und auch durch physikalische Mittel darf sein Zustand nicht wesentlich verändert sein; z. B. es darf nicht einmal mit verdünntem Glycerin oder Alkohol behandelt worden sein,

während kurze Behandlung mit Normalsalzwasser nicht sehr schadet: auch darf es nicht vorher durch Hitze koagulirt werden.

Allgemein wird ferner geglaubt, zur Reaktion der Nerven auf Methylenblau sei die Gegenwart von Sauerstoff nöthig. Man legt daher auch gewöhnlich das gewünschte Organ nach der Injektion oder Durchtränkung mit Methylenblau frei und lässt es einige Zeit an der Luft liegen. Apáthy (l. c. p. 25) zeigt jedoch, dass diese Praxis zwar in einzelnen Fällen richtig, die Annahme jedoch irrig ist. Er geht davon aus, dass es sich hier um eine regressive Färbung handle. Wenn nämlich ein Gewebe das Maximum der Färbung erreicht hat. so giebt es bald nachher die Farbe wieder an die umgebende Flüssigkeit ab (s. oben p. 178). Je grösser nun die Menge von dieser ist. desto rascher wird sich die Farbe auswaschen; und damit das nicht so ungemein schnell vor sich gehe, dass die Nervenfasern gleich den schon früher gefärbten Elementen wieder farblos werden (während man doch nur letztere auswaschen will, um die Nerven allein gefärbt hervortreten zu sehen), ist es oft wünschenswerth, möglichst wenig Flüssigkeit zu verwenden. Ferner nehmen die Präparate beim Liegen an der Luft aus dieser eine Spur Ammoniak auf, und Apáthy hat experimentell festgestellt, dass dies ein wichtiger Faktor für eine scharfe Färbung ist. Dagegen hat nach ihm der Sauerstoff nichts dabei zu thun.

290. Färbung der Nerven durch Injektion oder Immersion. In Anlehnung an Ehrlich hat man früher die Lösung von Methylenblau in die Leibeshöhle oder das Gefässsystem des lebenden Thieres injizirt, eine Zeit lang auf das gewünschte Organ wirken lassen und dieses dann zu weiterer Präparation und zum Studium freigelegt. Einige Forscher scheinen geglaubt zu haben, es sei nothwendig oder wenigstens gut, den Farbstoff in das ganze Thier zu injiziren. Indessen weiss man jetzt, dass das im Allgemeinen gleichgültig ist, und dass die Reaktion ebenso gut eintritt, wenn man das Organ erst herausschneidet und dann wie gewöhnlich in die Färbflüssigkeit legt. Mithin mag man im Allgemeinen die Bequemlichkeit darüber entscheiden lassen, ob man die Injektion oder die Immersion anwendet. Aber es scheint doch fast so, als wenn in einzelnen Fällen die Injektion, wenn auch nicht geradezu nothwendig, so doch besser sei.

291. Die Färblösungen. Zur Injektion macht man sie gewöhnlich in Salzwasser (dem normalen oder einem etwas schwächeren),

zur Immersion entweder auch so oder in einer anderen „indifferenten“ Flüssigkeit oder in reinem Wasser. Man hat sie in sehr verschiedenen Stärken angewandt. Früher nahm man gewöhnlich konzentrirte Lösungen: Arnstein (Anat. Anzeiger 2. Jahrg. 1887 p. 125) injizirt 1 ccm davon in die Vena cutanea magna eines Frosches und schneidet das gewünschte Organ 1 Stunde später heraus; Biedermann (Sitz. Ber. Akad. Wien 96. Bd. 1887 3. Abth. p. 23) injizirt $^1/_2$—1 ccm einer nahezu gesättigten Lösung in 0,6 $^0/_0$ igem Salzwasser in den Thorax von Flusskrebsen und tödtet sie nach 2—4 Stunden; S. Mayer (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 423) verwendet Lösungen von 1 : 300 bis 1 : 400 in $^1/_2$ $^0/_0$ igem Salzwasser. Injiziren kann man entweder mit einer Spritze oder einem anderen Apparat oder durch Autoinjektion vom Herzen aus. Sogar Kaninchen vertragen dies, wenn die Athmung künstlich unterhalten wird. Retzius verwendet ebenso starke Lösungen. Für Nemertinen nimmt Bürger (Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1891 p. 206; Fauna Flora Golf. Neapel 22. Monogr. 1895 p. 443) eine $^1/_2$ $^0/_0$ ige Lösung in Wasser oder $^1/_2$ $^0/_0$ igem Salzwasser; er injizirt sie und lässt dann die Thiere 6—12 Stunden, auch noch länger, in feuchtem Fliesspapier liegen. Die jetzige Praxis neigt dagegen entschieden mehr zu schwächeren Lösungen: Apáthy (Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 26) hält es nicht nur für überflüssig, sondern sogar geradezu für schädlich, sie stärker als 1 : 1000 zu wählen. (S. jedoch § 770.)

Zur Immersion mag man ähnliche Lösungen verwenden wie zur Injektion, aber sie sollten eher noch schwächer sein. So bringt Dogiel (Arch. Mikr. Anat. 35. Bd. 1890 p. 308) die Objekte in einige Tropfen von Humor aqueus, giebt 2 oder 3 Tropfen einer $^1/_{16}$- bis $^1/_{15}$ $^0/_0$ igen Lösung von Methylenblau in Normalsalzwasser hinzu und setzt sie hierin der Luft aus; in dünnen Geweben wirkt die Farbe bereits nach 5—10 Minuten und erreicht das Maximum in 15—20 Minuten; für dickere Objekte, z. B. die Retina, können mehrere Stunden erforderlich werden, und dabei muss man das Präparat durch abwechselnden Zusatz von 1 oder 2 Tropfen des Humor aqueus und der Färblösung gerade feucht halten. Die Reaktion wird durch Einlegen des Präparates in einen Brütofen bei 30—35 ^{0} C. beschleunigt. Rouget (Compt. Rend. Tome 117 1893 p. 802) modifizirt für Froschmuskeln die Methode von Dogiel dahin, dass er eine $^1/_{20}$ $^0/_0$ ige Lösung in 0,6 $^0/_0$ igem Salzwasser anwendet. Allen (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 36 1894 p. 461, 483) bedient sich

bei den Embryonen von *Homarus* einer Lösung von $^1/_{10}$ % in Normalsalzwasser und verdünnt sie mit dem 15—20fachen Volumen an Seewasser.

Lavdowsky (Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1895 p. 177) legt die Gewebe in eine $^1/_{10}$—$^1/_4$ %ige Lösung des Blaus in Hühnereiweiss (auch Blutserum, sowie Lösungen von Chlorammonium und Ferrum ammoniochloratum eignen sich als Menstruum) und erhält damit unvergleichlich viel mehr nervöse Elemente gefärbt als mit den gewöhnlichen Lösungen.

292. Apáthys Methoden. Als gutes Beispiel für diese Art von Studium gebe ich hier einen kurzen Abriss der Methode, die Apáthy (Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 15) für Hirudineen empfiehlt. Ein Stück des Bauchstranges wird freigelegt oder auch herauspräparirt, aber den Blutsinus und das pigmentirte Bindegewebe lässt man besser noch darum, bis Färbung und Fixirung beendet sind. Will man jedoch ausser den Fasern auch möglichst viele Ganglienzellen gefärbt haben, so schneidet man Seitennerven und Konnektive nahe beim Ganglion durch. Dann wird das Präparat in die Flüssigkeit zum Färben gelegt; diese besteht, wenn es sich hauptsächlich um die Fasern bei *Hirudo* und *Pontobdella* handelt, entweder aus einer Lösung von 1 : 1000 in $^1/_2$— $^3/_4$ %igem Salzwasser (man lässt sie 10 Minuten lang wirken) oder aus einer Lösung von 1 : 10000 (1—1$^1/_2$ Stunden) oder von 1 : 100000 (3 Stunden); *Lumbricus* erfordert überall die doppelte Zeit, *Astacus* und *Unio* die dreifache, markhaltige Nerven von Wirbelthieren die vierfache. Zur Demonstration von Ganglienzellen lässt man den Farbstoff 3—4 mal so lange wirken.

Ist die Färbung nun beendet, so wäscht man die Präparate, die in der Lösung von 1 : 1000 waren, in Salzwasser 1 Stunde lang, die aus der von 1: 10000 nur $^1/_4$ Stunde, und die von 1 : 100000 gar nicht; dann giesst man eins von den ammoniakalischen Fixir- und Differenzirgemischen (§ 293) über sie und lässt sie, ohne sie darin herum zu bewegen, wenigstens 1 Stunde lang so liegen, womöglich im Dunkeln. Die Weiterbehandlung s. im § 293.

Das Ammoniak in diesen Gemischen dient zur Differenzirung der Färbung. Es wäscht nämlich die Farbe aus gewissen Elementen heraus, aus anderen hingegen nicht so leicht, wirkt also gerade wie die Salzsäure beim Boraxkarmin. Ausgewaschen werden hier die protoplasmatischen) Theile der Nervenfasern, ihre „interfibrilläre“ und „perifibrilläre“ Substanz, während die „Primitivfibrillen“ den Farbstoff noch stark zurückhalten. Von theoretischem Interesse ist es, dass

nach Apáthy hierdurch eine echte Färbung dieser Primitivfibrillen zu Stande kommt, keine Imprägnation: die Fibrillen sind scharf violettblau gefärbt ohne körniges Präcipitat, während die Inter- und Perifibrillärsubstanz nebst den Kernen entweder gar nicht oder nur sehr hell gefärbt ist. Dagegen geben die gewöhnlichen Methoden die „inverse“ Reaktion, d. h. die Primitivfibrillen bleiben farblos, während Interfibrillärsubstanz und Protoplasma der Nervenfasern mit einem feinkörnigen grünschwarzen oder violetten Präcipitat imprägnirt und die Kerne wie gewöhnlich gefärbt sind.

293. Konserviren der Präparate. Haltbare Präparate gewinnen ist gar nicht leicht, denn die Farbe hält sich so wenig, dass sie, wie oben erwähnt, sogar im lebenden, noch nicht völlig imprägnirten Gewebe nach kurzer Zeit wieder abblasst. Indessen lässt sie sich doch einigermaassen fixiren.

Dogiel (Arch. Mikr. Anat. 33. Bd. 1889 p. 440) bringt wie Arnstein (Anat. Anzeiger 2. Jahrg. 1887 p. 551) die Präparate in eine gesättigte wässerige Lösung von Ammoniumpikrat auf $^1/_2$ Stunde oder länger, wäscht sie darauf mit frischer Lösung und studirt sie dann entweder in verdünntem Glycerin oder hebt sie für immer in Glycerin, das mit Ammoniumpikrat gesättigt ist, auf. Neuerdings (Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 15) empfiehlt er sie im Pikrat 18—24 Stunden zu lassen und dann direkt in ganz reinem säurefreiem Glycerin einzuschliessen. Allerdings macerirt das Ammoniumpikrat manche Gewebe sehr, aber man kann dem durch Zusatz von 1—2 % einer 1 %igen Osmiumsäurelösung abhelfen. Und will man die Gewebe zum Schneiden härten, so muss man die Osmiumsäure darin vervierfachen.

S. Mayer (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 422) verwendet ein Gemisch gleicher Theile von Glycerin und gesättigter Lösung von Ammoniumpikrat zum Fixiren der Färbung und Einschliessen der Präparate. Im Prinzip gleich ist die Methode von Retzius (Internation. Monatschr. Anat. Phys. 7. Bd. 1890 p. 328). Indessen hält Dogiel nach sorgfältigem Studium dies durchaus nicht für eine Verbesserung.

Andere Forscher nehmen eine gesättigte Lösung von Jod in Jodkalium (so Arnstein) oder Pikrokarmin (so Feist in: Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. 1890 p. 116; Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 231), und letzteres gewährt noch den Vortheil, das Blau der Färbung als solches zu erhalten, falls man es nicht zu lange einwirken lässt und das Präparat in reinem Glycerin einschliesst. Lavdowsky hat reine Pikrin-

säure empfohlen, aber auch diese wird nach sorgfältiger Prüfung von Dogiel verworfen.

Nach Apáthy (Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 30) ist freies Ammoniak ein Hauptfaktor beim Differenziren der Färbung (s. oben p. 182). Er bringt die Präparate — nach dem Auswaschen in Salzwasser, wenn sie in starker Lösung gefärbt waren, sonst aber direkt — entweder in eine konzentrirte wässerige Lösung von Ammoniumpikrat, die keine freie Pikrinsäure, dagegen auf je 100 ccm 5 Tropfen starken Ammoniaks enthält, oder, was im Allgemeinen besser ist, in eine 1—2 %ige frische Lösung von Ammoniumkarbonat, die mit Ammoniumpikrat gesättigt ist. Darin bleiben sie, am besten im Dunkeln, wenigstens 1 Stunde und kommen dann in eine geringe Menge von 50 %igem Glycerin, das mit Ammoniumpikrat gesättigt ist, so lange, bis sie ordentlich damit durchtränkt sind. Von da gelangen sie in ein ebenfalls mit dem Pikrat gesättigtes Gemisch von 2 Theilen 50 %igem Glycerin, 1 Theil kalt gesättigter Zuckerlösung und 1 Theil kalt gesättigter Gummilösung. Sind sie damit gut durchtränkt, so werden sie endlich in einen Syrup eingeschlossen, der so bereitet wird (l. c. p. 37): ausgesuchtes Gummi arabicum, Rohrzucker und destillirtes Wasser je 50 g werden auf dem Wasserbade gelöst und mit 0,05 g Thymol versetzt. Dies Medium wird rasch so hart wie Balsam, man braucht also die Deckgläser nicht zu umrahmen. Auch das Gemisch von Farrants (aber ohne die arsenige Säure) ist gut, indessen keinem von beiden darf man Ammoniumpikrat oder Methylenblau zusetzen.

Die Präparate nach dieser Methode sind äusserst empfindlich gegen das Licht (ob dies auch von denen nach Parkers oder Bethes Methode, s. § 294, gilt, weiss ich nicht), freilich nicht so sehr gegen diffuses Tageslicht wie gegen das konzentrirte des Kondensors bei der Beobachtung. Besonders schädlich ist nach Apáthy das Lampenlicht, zumal wenn es wegen der starken Linsen intensiv gebraucht wird, und dies liegt zum Theil an seinen gelben Strahlen, zum Theil an seiner Wärme.

Ganz vor Kurzem (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1897 p. 712) giebt Apáthy noch an, im Gummisyrup seien die Präparate seit 5–6 Jahren ganz unverändert; jedoch gelte dies nicht von denen, wo er die Differenzirung mit Ammoniak bis zur optischen Isolirung der Neurofibrillen getrieben habe, denn diese seien längst verblasst.

294. Methoden für Schnitte. Keine der obigen Methoden reicht völlig aus, da man nach ihnen die Präparate nicht unbeschädigt in Paraffin bringen kann. Die Farbe bleibt in der Regel nicht schön blau, sondern wird zu einem Grau, dessen Ton von rothbraun zu blau oder grünlich schwarz variirt. Selten halten sie sich länger als einige Monate, auch können sie nicht in Balsam eingeschlossen werden. Eine starke Lösung von Platinchlorid soll hingegen nach Feist (l. c.) das Einbetten in Celloidin oder Paraffin erlauben, jedoch giebt sie einen flockigen Niederschlag, und die Präparate stellen nicht sonderlich zufrieden. Daher ist Parkers Methode (Z. Anzeiger 15. Jahrg. 1892 p. 375) ein sehr willkommener Schritt vorwärts. Zunächst wird der Farbstoff als ein feinkörniger, röthlicher Niederschlag durch eine kalte konzentrirte Lösung von Sublimat fixirt, dann wird das Präparat in einer Lösung von 1 g Sublimat in 5 ccm Methylal entwässert, gelangt darauf in ein Gemisch von 1 Theil dieser Lösung mit 1 Theil reinem Methylal und 2 Theilen Xylol, endlich in viel reines Xylol. Hier bleibt es, bis alles Methylal durch Xylol ersetzt und das Sublimat ganz ausgewaschen ist, also etwa 4—5 Tage. Nun schliesst man das Präparat entweder in Balsam ein oder bringt es zum Schneiden wie gewöhnlich in Paraffin. Die Schnitte werden mit Kollodium nach Schällibaum aufgeklebt, nicht mit Mayers Eiweiss, das die Farbe auszieht. Einige Wochen halten sich die Präparate, aber die feineren Einzelheiten verblassen leicht schon nach 1 Monat. In einer späteren Arbeit (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1895 p. 4) entwässert Parker statt mit Methylal einfach mit 8 $^0/_0$igen Lösungen von Sublimat in Alkohol von 30, 50, 70, 95 und 100 $^0/_0$ und bringt die Objekte aus der letzten in ein Gemisch von gleichen Theilen dieses 100 $^0/_0$igen Sublimat-Alkohols und Xylol, endlich in reines Xylol; hierin können sie beliebig lange bleiben.

Bethe (Arch. Mikr. Anat. 44. Bd. 1894 p. 585) löst Ammoniummolybdänat (1 g) in destillirtem Wasser (10 ccm), giebt Wasserstoffhyperoxyd (1 g) hinzu, wodurch die Mischung gelb wird, und dann 1 Tropfen Salzsäure (der weisse Niederschlag von Molybdänsäure löst sich beim Umschütteln wieder). In dieses Gemisch, das höchstens 8 Tage alt und am besten auf etwa 0 Grad abgekühlt sein sollte, kommen die gefärbten und mit Salzwasser abgespülten Objekte auf 2—3 Stunden, wenn sie klein sind, auf 4—5, wenn sie etwa 1 ccm gross sind. Dann werden sie $^1/_2$—2 Stunden lang mit Wasser ge-

waschen, in Alkohol (womöglich ebenfalls bei etwa 0°) entwässert und wie gewöhnlich in Celloidin oder durch Xylol in Paraffin eingebettet.

Obige Vorschrift gilt für Vertebraten; für Invertebraten nimmt man 1 g Ammoniummolybdänat, 10 ccm Wasser und 1/2 ccm Wasserstoffhyperoxyd.

Neuerdings verfährt Bethe (Anat. Anzeiger 12. Bd. 1896 p. 438) folgendermaassen. Nach dem Färben behandelt er mit einer konzentrirten wässerigen Lösung von Ammoniumpikrat die Stücke von 2—3 mm Dicke etwa 10—15 Minuten lang und bringt sie dann direkt in eine Lösung von Ammoniummolybdänat (1 g) in Wasser (20 g; oder 10 g und ebenso viel 1/2 %ige Osmiumsäure oder 2 %ige Chromsäure) oder von Natriumphosphormolybdänat (Proportion genau so); alle diese 6 Lösungen erhalten als Zusatz 1 Tropfen Salzsäure und nach Belieben auch 1 g Wasserstoffhyperoxyd. (Gegen Alkohol sind die Objekte, wenn sie in einer von den 3 Lösungen des Natriumsalzes gewesen sind, nicht so widerstandsfähig, daher ist hier eine Temperatur unter 15° C. vortheilhaft; aber sie scheinen sich besser in Balsam zu halten.) In einer von den Lösungen bleiben die Stücke etwa 3/4—1 Stunde (bei Gegenwart von Osmiumsäure 4—12 Stunden), kommen dann in Wasser, Alkohol, Xylol, Balsam oder Paraffin; die Schnitte werden mit Alaunkarmin, Alaunkochenille oder „neutralen“ Theerfarbstoffen nachgefärbt.

Eine leichte Abänderung der Methode von Bethe giebt Dogiel (Arch. Mikr. Anat. 49. Bd. 1897 p. 772) an.

Pleschko (Anat. Anzeiger 13. Bd. 1897 p. 16) legt die Objekte nach der Fixirung des Methylenblaus mit Ammoniumpikrat auf einige Tage in 10 %iges Formol und macerirt oder schneidet sie dann.

295. Imprägnation von Epithelien, Lymphräumen etc. mit Methylenblau nach Dogiel (Arch. Mikr. Anat. 33. Bd. 1889 p. 440). Geeignete Objekte, besonders dünne Membranen, werden frisch auf einige Minuten in eine 4 %ige Lösung von Methylenblau in Normalsalzwasser gebracht, dann auf 1/2 Stunde oder länger in eine gesättigte Lösung von Ammoniumpikrat, dann mit einem neuen Quantum derselben Lösung gewaschen und in verdünntem Glycerin untersucht.

Will man nur die Zellgrenzen im Epithel demonstriren, so darf man im Allgemeinen nur 10 Minuten lang färben; will man hingegen die Grundsubstanz des Gewebes imprägniren, um ein negatives Bild der Saftkanäle oder anderer Hohlräume zu bekommen, so färbe

man 15—20 Minuten, und es ist dann auch rathsam, das Endothel abzupräpariren, bevor man die Objekte in das Färbbad bringt. Um die Präparate aufzuheben, schliesst man sie am besten in Glycerin ein, das mit Ammoniumpikrat gesättigt ist. (Ueber eine Verbesserung der Methode s. oben p. 183.)

Der Effekt ist im Ganzen, abgesehen von der Farbe, gleich dem einer negativen Imprägnation mit Silber.

296. Imprägnation nach S. Mayer (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 422). Mayer hat seine Experimente zu gleicher Zeit wie Dogiel ausgeführt und dieselben Resultate erhalten. Er färbt die Gewebe etwa 10 Minuten lang in einer Lösung von Methylenblau (1:300 bis 400) in $^1/_2$ %igem Salzwasser, wäscht sie mit Salzwasser aus und giesst das Gemisch von Glycerin und Ammoniumpikrat (oben p. 183) darauf. Nach seiner Erfahrung können alle wichtigen Resultate einer Imprägnation mit Silber auch durch Methylenblau erzielt werden. Die Bilder sind entweder positiv oder negativ; hat man das Methylenblau in das Gefässsystem injizirt, so sind die positiven häufiger, hat man aber das Objekt (die Cornea) in die Färblösung gelegt, so sind sie öfter negativ.

297. Andere Anwendung von Methylenblau. Es wird, hauptsächlich in Verbindung mit anderen Farbstoffen, auch zum Tingiren fixirter und gehärteter Gewebe gebraucht, besonders für das Centralnervensystem; s. hierüber die betreffenden Kapitel.

16. Kapitel.

Färben des Plasmas mit Theerfarbstoffen.

298. Ueber das Färben des Plasmas im Allgemeinen. Unter einem Plasmafarbstoff versteht man im Allgemeinen einen solchen, der das Zellplasma und die Grundsubstanz der Gewebe, oder auch nur eins von beiden, färbt. Man sollte aber eigentlich genauer zwischen Farbstoffen für das Cytoplasma, die Granula, die Grundsubstanz etc. unterscheiden. Indessen wird auch der unbestimmte allgemeine Sinn dieses Ausdrucks für die Zwecke dieses Kapitels genügen. In den früheren Auflagen meines Buches kämpfte ich gegen die zwecklose Verwendung der Plasmafarbstoffe an, muss aber jetzt zugeben, dass sie mit der zunehmenden Verfeinerung der Probleme in der Histologie doch sehr oft nothwendig geworden sind. Die Histologie macht nämlich nicht mehr beim Studium der Gruppirung der Zellen halt, sondern stellt gegenwärtig auch Fragen nach den Differenzirungen der Zellen selber und der Intercellularsubstanzen. Daher sind gute Plasmafarbstoffe ein grosses Bedürfniss. Leider kann man kaum sagen, dass es welche giebt, denn die Anforderung genügt nicht, dass ein Plasmafarbstoff nur die extranuclearen Theile der Zelle überhaupt färbe, sondern man darf verlangen, dass er dies möglichst elektiv thue. Nun färben aber alle Plasmafarbstoffe mehr oder weniger diffus; zwar entfalten manche eine beträchtliche Elektivität, aber sie sind durchaus nicht immer leicht dazu zu veranlassen, gerade die gewünschte Elektivität zu entwickeln. Und die dies nicht thun, sind beinahe oder ganz werthlos. Ich habe daher viele Formeln weggelassen, die mir nur geringe oder gar keine wissenschaftliche Bedeutung zu haben schienen, und auch nicht einmal mehr die Quellen angegeben, wo sie in der Literatur zu finden sind.

299. Pikrinsäure. Mit Flemming (Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 360) halte ich die Pikrinsäure für den nützlichsten aller Plasmafarbstoffe. Sie ist mit Vortheil nach den meisten Kernfarbstoffen, besonders

nach Karmin- und Hämateïngemischen, anwendbar; jedoch muss man dabei einige Vorsicht üben, da man leicht damit überfärbt und dann die Kernfärbung schädigt. Dies gilt besonders von den Hämateïngemischen, die ja gegen alle Säuren sehr empfindlich sind. Im Uebrigen hat man weiter nichts zu thun, als die Pikrinsäure in dem Alkohol zu lösen, den man zum Entwässern der mit dem Kernfarbstoff gefärbten Objekte nimmt; für Schnitte ist ebenso bequem eine Lösung in Xylol oder Chloroform.

Man vergesse ferner nicht, dass die Pikrinsäure andere Theerfarbstoffe beträchtlich auswäscht, und dass sie im Verein mit Salzsäure deren Fähigkeit, die Karminfärbung auszuziehen, beträchtlich erhöht. Man löse sie daher auch nicht in dem sauren Alkohol, den man nach Boraxkarmin etc. braucht, sondern erst in dem neutralen Alkohol. Endlich leistet sie, was nur sehr wenige Plasmafarbstoffe vermögen, nämlich zum Durchfärben ganzer Objekte zu dienen; und da sie äusserst leicht eindringt, so ist sie sehr brauchbar für die Präparation von kleinen Arthropoden, Nematoden etc., die unzerlegt eingeschlossen werden sollen.

300. Orange G. Zu beziehen von Grübler & Hollborn und nicht mit den vielen anderen Handelsmarken zu verwechseln, die als Orange (mit oder ohne G) gehen. Es ist nicht nur ein saurer Farbstoff im Sinne von Ehrlich, sondern reagirt nach Flemming (Arch. Mikr. Anat. 37. Bd. 1891 p. 685) in wässeriger Lösung wirklich sauer.[1]) Die Lösungen halten sich nicht gut, sondern setzen sehr rasch ein Pulver ab. Das Orange G gehört zu den schärfsten Plasmafarbstoffen, färbt aber nur blass und ist daher mit Nutzen nur zum Nachfärben nach Eisenhämatoxylin, Hämalaun oder einem anderen blauen oder rothen Kernfarbstoff zu verwenden. Ich brauche es in konzentrirter wässeriger Lösung und lasse es nur auf Schnitte 5—10 Minuten lang einwirken. Ueberfärbung kommt dabei nicht vor, wohl aber können andere Theerfarbstoffe ausgewaschen werden. Hauptsächlich dient es übrigens in Verbindung mit Theerfarbstoffen, z. B. in Flemmings Orange (§ 301) und in Ehrlichs Gemisch (§ 306).

[1]) Dies kann ich nicht finden. Orange G ist das Natronsalz einer Disulfosäure. Aus Natriumbikarbonat treibt es keine Kohlensäure aus und reagirt auch auf Lakmuspapier nicht sauer. Ich habe sowohl welches von Grübler als auch von der Berliner Aktiengesellschaft für Anilinfabrikation geprüft. Wahrscheinlich hatte Flemming kein ganz reines Produkt vor sich. [M.]

301. Orange nach Flemming (Arch. Mikr. Anat. 37. Bd. 1891 p. 295. 685). Es wirkt durch Substitution. Man färbt die Schnitte 2—3 Tage, oder, falls man eine sehr starke Färbung wünscht, sogar Wochen. in starker alkoholischer Lösung von Safranin, die mit Anilinwasser verdünnt ist (oben p. 169), wäscht sie mit destill. Wasser ab, differenzirt sie in absolutem Alkohol, der höchstens $^1/_{10}$% Salzsäure enthält, bis kaum noch Farbe ausgezogen wird, färbt sie dann 1—3 Stunden in Gentianaviolett (entweder in sehr starker wässeriger Lösung oder nach Gram, s. § 279), wäscht sie rasch in destillirtem Wasser aus und lässt nun eine konzentrirte oder wenigstens recht starke wässerige Lösung von Orange auf sie wirken, die als saurer Farbstoff das meiste Violett wegnimmt. Nach höchstens einigen Minuten bringt man die Schnitte, während sie beim Umrühren noch blassviolette Wolken fahren lassen, in absoluten Alkohol, bis sie kaum noch Farbe abgeben, von da in Nelken- oder Bergamottöl und schliesst in Dammar oder Balsam ein, bevor noch die letzten hellen Farbwolken ganz verschwunden sind. (Das Orange muss unbedingt das Orange G sein; s. § 300.)

Das Orange wirkt hierbei nicht als besonderer Farbstoff, sondern differenzirt nur das Gentianaviolett.

Flemming hat die oben beschriebene Methode wohl nur auf lose Schnitte angewandt; für aufgeklebte finde ich sie nicht ganz so gut. Denn das Orange hat mir nie das Violett ausgewaschen, jedenfalls löst sich die Farbe nicht in Wolken ab. Ich habe mit Vortheil das Orange wenigstens $^1/_4$ Stunde lang einwirken lassen, dagegen scheint mir für das Violett $^1/_2$ Stunde völlig zu genügen. Die Färbung ist übrigens sehr launenhaft, und man ist nie des Erfolges sicher. Daher und auch aus anderen Gründen ziehe ich meist Safranin und Kernschwarz (§ 334) etc. vor. — Siehe auch Flemming in: Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. 1897 p. 175.

302. Reinkes Modifikation des Orange nach Flemming (Arch. Mikr. Anat. 44. Bd. 1894 p. 262 und 283). Schnitte von Material, das nach Hermann fixirt worden ist, kommen auf 24 Stunden in eine konzentrirte Lösung von Kalium sulfurosum, werden dann gewaschen, 1—2 Stunden lang mit Safranin gefärbt. wieder gut gewaschen und nun 24 Stunden in einem „neutralen“ Gemisch von Gentianaviolett und Orange gefärbt, das man wie folgt bereitet.

Zu einer konzentrirten wässerigen Lösung des Violetts setzt man einige Tropfen einer eben solchen Lösung von Orange; es entsteht ein Niederschlag (von „neutraler“ Farbe), der sich aber bei Zusatz von Wasser fast ganz wieder löst. (Auf Filtrirpapier muss ein Tropfen einen violetten oder braunen Fleck mit schmalem orangegelbem Rande liefern.) Das Gemisch wird nicht filtrirt, sondern dient direkt zum Färben; man spült die Schnitte nachher mit Wasser ab, taucht sie rasch in absoluten Alkohol und bringt sie in Nelkenöl. Durch Zusatz von $^1/_3$ Volumen Alkohol wird das „neutrale“ Gemisch klar und haltbar; beim Gebrauch ist es mit Wasser zu verdünnen.

Ich habe die Methode probirt und genau dieselben Resultate erhalten wie nach der Flemmingschen, weiss aber nicht aus Erfahrung, ob sie auch nur um ein Haar weniger capriciös ist als diese.

303. Metanilgelb (Griesbach in: Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 448). Soll besonders Bindegewebe färben.

304. Säuregelb (Echtgelb), Tropäolin O, Croceïn (Griesbach in: Arch. Mikr. Anat. 22. Bd. 1883 p. 132).

305. Säurefuchsin (Fuchsin S, Rubin S, Säurerubin, Magenta S). Nicht zu verwechseln mit dem gewöhnlichen Fuchsin, wie mitunter geschehen zu sein scheint. S. auch § 268 und wegen des Unterschiedes zwischen Fuchsin S und Rubin S § 769.

Es ist einer der besten Plasmafarbstoffe. Ich verwende es als $^1/_2$ %ige wässerige Lösung und lasse es auf Schnitte etwa 5 Minuten lang wirken, indessen ist es ein Zufall, wenn man hierbei genau die gewünschte Wirkung erzielt. Eine zu starke Färbung lässt sich übrigens sehr leicht durch ganz schwaches Alkali, am besten Brunnen- oder Leitungswasser, wieder wegschaffen. Hauptsächlich dient es zum Färben von Nerven (s. § 700, 722, 769) sowie als Ingrediens in dem „Triacid“ von Ehrlich (§ 307) und dem

306. Gemisch von Ehrlich, Biondi oder R. Heidenhain (Arch. Phys. Pflüger 43. Bd. 1888 Suppl. p. 40; Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 520). Es ist nicht leicht herzustellen, aber fertig bei Grübler & Hollborn zu haben.

Man giesst unter Umrühren zu 100 ccm einer gesättigten wässerigen Lösung von Orange 20 ccm einer ebensolchen Lösung von Säurefuchsin und 50 ccm von Methylgrün und verdünnt das Gemisch mit dem 60—100fachen an Wasser; es muss nun bei Zusatz von Essigsäure roth werden, ferner muss ein Tropfen auf Filtrirpapier einen in der Mitte blaugrünen, am Rande orangegelben Fleck geben; ist nach aussen vom Orange noch eine breitere rothe Zone vorhanden, so enthält das Gemisch zu viel Säurefuchsin.

Nach Krause (Arch. Mikr. Anat. 42. Bd. 1893 p. 59) lösen sich in 100 ccm Wasser ungefähr je 20 g Rubin S. 8 g Orange G und 8 g Methylgrün (die Farbstoffe stammen aus der Aktiengesellschaft für Anilinfabrikation in Berlin). Von den konzentrirten Lösungen nun giesst man vorsichtig 4 ccm der ersten, 7 der zweiten und 8 der dritten ab und gewinnt so die klare Stammlösung, die man beim Gebrauch mit Wasser auf das 50—100fache verdünnt. Vor der Färbung bringt man vortheilhaft die Paraffinschnitte auf 1—2 Stunden in eine $^1/_5$ %ige Essigsäure, färbt sie 24 Stunden lang und wäscht sie dann direkt mit 90 %igem Alkohol, der auf je 100 ccm 2—4 Tropfen Essigsäure enthält, aus. Nach M. Heidenhain (Festschr. Kölliker Leipzig 1892 p. 116; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 202) hat man zu nehmen Orange G, Rubin S und Methylgrün OO, und zwar müssen alle drei unbedingt von der oben erwähnten Bezugsquelle stammen.

Israel (Praktikum Path. Hist. 2. Aufl. Berlin 1893 p. 69) giebt nach mündlicher Mittheilung von R. Heidenhain folgende Vorschrift zur Bereitung des

Gemisches: das von Grübler & Hollborn zu beziehende Pulver löst man in destill. Wasser zu einer 12 $^0/_0$igen Stammlösung auf, verdünnt 1 ccm davon mit 30 ccm Wasser, gibt 3 ccm einer $^1/_2$ $^0/_0$igen wässerigen Lösung von Säurefuchsin hinzu und säuert das Gemisch mit 5—6 Tropfen Essigsäure (1 Eisessig : 500 Wasser) an. Die gefärbten Schnitte kommen direkt in Alkohol von 90 $^0/_0$.

Die starken Lösungen, wie sie oben angegeben sind, liefern bei der Mischung leicht Präcipitate; Squire (Methods p. 37) empfiehlt daher, sie vorher zu verdünnen.

Die Methode gilt nur für Schnitte. Diese werden 6—24 Stunden lang gefärbt, mit Alkohol entwässert und dann durch Xylol in Xylolbalsam übergeführt. Die Färbung soll nach den Intentionen ihrer Erfinder progressiv sein, nicht regressiv; sie bedarf also keiner Differenzirung, und die Schnitte müssen daher durch Wasser, Alkohol und Xylol so rasch wie möglich hindurch, damit jeglicher Verlust an Farbe vermieden werde. Die einzige Schwierigkeit dabei ist eben nur, dafür zu sorgen, dass der Alkohol nicht das Methylgrün auszieht. Ist übrigens (s. M. Heidenhain in: Arch. Mikr. Anat. 35. Bd. 1890 p. 178) der Alkohol leicht alkalisch, so wird dadurch im Schnitte das Roth relativ blass, das Grün relativ stark; ist er leicht sauer, so tritt das Gegentheil ein. Auch wirkt das Fuchsin S in alten Lösungen oft schwächer als sonst; dann muss man von ganz schwacher Essigsäure so viel zusetzen, bis das Roth der Lösung merklich stärker geworden ist.

Alle diese Vorsichtsmaassregeln sichern die korrekte Wirkung des Färbgemisches noch nicht, besonders wenn es sich um die Attraktionssphären und andere achromatische Elemente handelt. M. Heidenhain (Festschr. Kölliker p. 116) giebt daher genauere Instruktionen. Die Färbungen mit dem gewöhnlichen Gemisch bleichen nämlich leicht aus; säuert man es an, so werden sie stärker, schärfer und haltbarer, nimmt man aber zu viel Säure, so färben sich auch die Interfilarsubstanzen. Man nehme also die bei Grübler & Hollborn käufliche Stammlösung und verdünne sie mit Wasser etwa im Verhältniss von 3 : 200. Dann säuere man diese Flüssigkeit mit ganz schwacher Essigsäure (1 : 500) vorsichtig an, bis sie bei noch viel stärkerer Verdünnung (einige Tropfen auf ein Becherglas voll destill. Wasser) nicht mehr eine Mischfarbe vom Roth des Rubins, Gelb des Orange und Grau des Methylgrüns zeigt, sondern „kräftig karmoisinroth“ und nur noch wenig graulich aussieht. „Fallen die Präparate

dann noch nicht ganz nach Wunsch aus, so müssen noch geringe Mengen Säure zugesetzt werden."

Die Schnitte bringt man vor dem Färben ein paar Stunden lang in $^1/_{10}$%ige Essigsäure, dann 10—15 Minuten lang in offizinelle Jodtinktur, spült sie mit Alkohol ab und lässt sie nun im Färbgemisch 12—18 Stunden verweilen. Nachher spült man sie der Reihe nach kurz mit destillirtem (oder ganz schwach angesäuertem) Wasser, absol. Alkohol und Xylol ab und schliesst sie in Xylolbalsam ein. Die Säure soll dazu dienen, dass die Schnitte noch sauer in den Balsam kommen, das Jod soll hauptsächlich alles Quecksilber aus den Geweben entfernen (M. Heidenhain konservirt nämlich mit Sublimat, indessen ist das Färbgemisch auch für Objekte aus Chrom-Osmiumgemischen brauchbar), verstärkt aber zugleich das Grün im Chromatin und bringt eine elektivere Färbung des Plasmas zu Stande.

Indessen selbst diese Vorsicht sichert nicht immer gute Resultate. Denn der richtige Säuregrad ist so wichtig, dass man nach Heidenhain (Arch. Mikr. Anat. 43. Bd. 1894 p. 430) das Gemisch nicht filtriren darf, weil es dadurch an Säure verlieren kann. Auch nehmen alte Lösungen Alkali aus dem Glase auf, und man muss sie daher wieder etwas ansäuern oder noch besser sie in Metall- oder Kautschukflaschen aufbewahren.

Trambusti (Ricerche Lab. Anat. Roma Vol. 5 1896 p. 82; Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 347) färbt die mit Essigsäure angesäuerten Schnitte 24 Stunden lang in einem Gemisch von 1 Theil Biondischen Gemisches (1:80), 150 Theilen Wasser und 2½ Theilen 1%iger Essigsäure. Drüner (Jena. Zeit. Naturw. 29. Bd. 1894 p. 276) hingegen weicht bedeutend von den anderen Forschern ab: er färbt die Schnitte mit dem konzentrirten Gemisch 10 Minuten lang, spült sie flüchtig mit Brunnenwasser ab, bringt sie auf 1 Minute in absoluten Alkohol mit $^1/_{10}$% Salzsäure, dann in reinen absoluten Alkohol und erhält so das Chromatin blauschwarz, das Plasma intensiv roth.

Nach einem sehr sorgfältigen Studium kann ich diese berühmte Färbung nur für ganz spezielle Zwecke empfehlen. Zunächst wird wohl anerkannt werden, dass ein Reagens, das man ohne die Befolgung obiger Maassregeln weder bereiten noch aufbewahren kann, für den täglichen Gebrauch gewöhnlicher Menschen viel zu fein ist. Zwar ist die Farbe, wenn sie geräth, sehr schön, aber sie geräth auch bei äusserster Vorsicht nicht immer. Sie ist eben sehr kapriziös und gibt selten zweimal hintereinander dasselbe Resultat. Man soll erhalten eine scharfe Kernfärbung, zugleich aber auch (durch das Säurefuchsin) eine scharfe Färbung des Plastins im Cytoplasma; indessen wird letztere

durch ein ganz geringes Mehr oder Weniger an Säure diffus, statt sich scharf auf das Plastin zu beschränken. Ferner geht das Methylgrün beim Entwässern so leicht aus den Kernen heraus, dass immer die Gefahr vorliegt, es ganz zu verlieren. Deswegen kann man nur ganz dünne Schnitte wirklich gut färben: mehr als 3 μ dick sollten sie nicht sein, und sind sie über 5 μ, so ist kaum noch auf ein gutes Resultat zu rechnen. Endlich scheinen sich die Präparate nicht lange zu halten; meine sind meist früher oder später verdorben, mitunter schon nach wenigen Tagen. (M. Heidenhain sagt allerdings, die seinen, die er mit Jodtinktur behandelt hatte — s. oben p. 193 — wären auch nach mehreren Jahren so gut wie zu Anfang.) Ich gebe gern zu, dass die Methode ihre Berechtigung für die ganz speziellen Objekte hat, für die sie erdacht wurde — die Körner in den Zellen (Ehrlich) oder das Plastinnetz (Heidenhain) und Aehnliches; aber, wie es Viele thun, sie ganz allgemein für die gewöhnliche Untersuchung von Schnitten zu empfehlen und brauchen, hiesse doch nur schädlich übertreiben. Das Ehrlich-Biondische Gemisch hat bei Weitem nicht die Eigenschaften einer normalen Färblösung für Schnitte und ist gänzlich ungeeignet für gewöhnliches Studium.[1])

Krause (Arch. Mikr. Anat. 49. Bd. 1897 p. 709) hält dagegen die Methode für leicht, sicher und vielfacher Anwendung fähig. Nur muss man wirklich konzentrirte Lösungen der 3 Farben nehmen, und diese selber müssen aus der Berliner Fabrik stammen (s. oben p. 191), während die Zusammensetzung der Stammlösung und der Grad ihrer Verdünnung beliebig variiren dürfen. Ganz ungeeignet ist Material aus Osmiumgemischen, Platinchlorid oder Salpetersäure, das beste das aus Sublimat (ohne oder mit Essigsäure).

307. Triacidgemisch von Ehrlich. Einer Gewohnheit zu Folge, die von Ehrlich herzurühren scheint, aber nicht sonderlich empfehlenswerth ist, nennt man Triacidlösung ein Gemisch derselben drei Farben wie bei dem von Ehrlich-Biondi (§ 306), worin aber die sogenannten sauren Farbstoffe überwiegen. Die Benennung ist falsch, denn das Methylgrün ist ja ein starker „basischer“ Farbstoff. Ich gebe im Folgenden (nach der Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 259) die neueste Vorschrift von Ehrlich, wie er sie Reinbach mittheilte.

---

[1]) Im Grossen und Ganzen bin ich mit Obigem einverstanden und möchte nur noch hinzufügen, dass die so ausführlichen Vorschriften zur Erzielung des richtigen Grades der Säure etc. mir zum Theil nur deswegen nothwendig erscheinen, weil man leider noch immer von sogenannten konzentrirten Lösungen ausgeht, statt sie ganz genau nach Maass oder Gewicht herzustellen. Wann ist eine solche Lösung konzentrirt und bei welcher Temperatur soll sie es sein? [M.]

Man nehme gesättigte wässerige Lösung von Orange G 120, von Säurefuchsin 80, von Methylgrün 100 Theile und setze dazu destill. Wasser 300, absol. Alkohol 80 und Glycerin 50 Theile. Die Lösungen müssen unbedingt gesättigt sein, das Gemisch darf man gar nicht umschütteln, sondern muss aus der Flasche ganz oben mit einer Pipette schöpfen. Dann hält es sich Jahre lang.

Ich habe es nicht selber gemacht, wohl aber das von Grübler & Hollborn bezogene geprüft. Danach scheint es mir in Vorzügen und Nachtheilen ungefähr zu sein wie das Gemisch von Ehrlich-Biondi; es färbt vielleicht stärker, aber weniger zart, und das Methylgrün scheint sich im Alkohol besser zu halten; daher mag es sich für gewöhnliche Arbeiten wohl eher eignen. Ich habe einige Male die Spindeln stark damit gefärbt erhalten. — Heidenhain (Morph. Arb. Schwalbe 7. Bd. 1897 p. 243) überfärbt mit dem Triacid die Schnitte, wäscht sie 12—24 Stunden lang in absolutem Alkohol aus und erhält so seine Centralkörper schwarz, die Cytomikrosomen rosenroth.

Die älteste Vorschrift von Ehrlich (Charité-Annalen 1884 p. 110) findet sich in Israels Praktikum d. path. Hist. (2. Aufl. Berlin 1883 p. 68) abgedruckt, ferner in: Arch. Path. Anat. 105. Bd. 1886 p. 517 (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 234). Sie enthält aber noch kein Glycerin. Ueber das Gemisch von Cuénot mit Orange III s. unten § 852.

Helianthin (Orange III, Methylorange, Goldorange), zuerst von Griesbach (Arch. Mikr. Anat. 22. Bd. 1883 p. 141) empfohlen, wird in wässeriger, mit Essigsäure angesäuerter Lösung von Masslow (Arch. Mikr. Anat. 51. Bd. 1897 p. 139) zum Färben des Blutes verwandt: nach dem Vorgang von Kultschitzky färbt er erst mit Hämateïnthonerde, dann mit Rubin (ebenfalls in schwacher Essigsäure gelöst), endlich mit Helianthin; dieses tingirt ausser den Leucocyten auch die Erythrocyten, die ihr Hämoglobin verloren haben.

308. Congoroth (Griesbach in: Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 379). Ebenfalls ein saurer Farbstoff im Sinne von Ehrlich; die wässerige Lösung reagirt aber neutral oder alkalisch. Es wird schon durch Spuren von freier Säure blau, ist daher ein gutes Reagens auf freie Säure in Geweben. Es färbt ähnlich wie Säurefuchsin und scheint gleich ihm besonders gut zum Tingiren von Axencylindern zu sein (§ 697 u. 724). Auch kann es zur Färbung intra vitam dienen (§ 213 und Loisel in: C. R. Soc. Biol. Paris (10) Tome 4 1897 p. 934). Ich habe es als Plasmafarbstoff benutzt, kann es aber nicht empfehlen, da es nicht haltbar färbt. Es ist übrigens nicht zu verwechseln mit Congogelb, Brillantcongo etc. S. auch unten § 348.

309. Benzopurpurin. Nach Griesbach (l. c.) ein anderer saurer Farbstoff, in seiner Wirkung sehr ähnlich dem Congoroth. Es ist als Plasmafarbstoff empfohlen worden, jedoch hat es mir überhaupt nicht gefärbt. Nach Zschokke (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1888 p. 466) färben schwache Lösungen von Benzopurpurin **B** schon in einigen Minuten; ähnlich wirke **Deltapurpurin.**

310. Neutralroth nach Ehrlich (Allg. Med. Zeit. 1894 p. 2, 20; Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 250; Galeotti, ibid. p. 193). Von Grübler & Hollborn zu beziehen, dient bisher nur zum Färben intra vitam: Froschlarven absorbiren nach 1—2 Tagen in einer Lösung von 1:10000 oder 1:100000 so viel Farbe, dass alle ihre Gewebe dunkelroth sind. Die Farbe ist aber auf die Körner im Zellplasma (Ehrlich) und den Inhalt der Schleimzellen (Galeotti) beschränkt. — S. Mayer (Lotos Prag 1896 N. 2) erwähnt kurz, dass entweder nach Einsetzen der Larven in Wasser mit Neutralroth oder nach Injiziren von Amphibien und Säugethieren (0,1 g Neutralroth auf 100 ccm $^1/_2$%iges Salzwasser) sich ausser den Granula in Haut, Knorpel etc. auch degenerirendes Nervenmark färbt.

311. Biebricher Scharlach liefert eine diffuse hellrothe Färbung, die vielleicht als Kontrast nützlich ist (Griesbach in: Arch. Mikr. Anat. 22. Bd. 1883 p. 140).

312. Die Eosine, im Handel als **Eosin, Saffrosin, Primerose soluble, Phloxin, Rose bengale, Erythrosin, Pyrosin B, Rose B à l'eau** etc. bekannt, sind sämmtlich Phthaleïn-Farben. Sie haben nicht ganz die gleichen Eigenschaften, sondern variiren nach den Fabriken. Die meisten sind in Wasser oder in Alkohol löslich, einige aber nur in Alkohol (Primerose à l'alcool). Alle geben übrigens diffuse Färbungen und wurden früher viel als Kontrastfarbstoffe benutzt. Hauptsächlich dienen sie in Verbindung mit anderen Farbstoffen (s. weiter unten). Ueber Rose bengale (in Verbindung mit Jodgrün und Bleu de Lyon) s. Griesbach in: Z. Anzeiger 6. Jahrg. 1883 p. 172.

Ueber Eosin als Spezifikum für rothe Blutkörperchen und für gewisse Körner in den weissen s. § 805, für Körner in Nervenzellen § 692 und 693. Auch der Dotter in manchen Eiern nimmt es stark auf, und so wird es für Embryologen mitunter nützlich. S. § 347.

313. Methylgrün und Eosin nach Calberla (Morph. Jahrb. 3. Bd. 1877 p. 625), nach List (Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 147), nach Balbiani (Ann. Microgr. Paris Tome 7 1895 p. 245) und nach Rhumbler (Zeit. Wiss. Z. 61. Bd. 1895 p. 38).

314. Methylenblau und Eosin nach Chenzinski (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 260), nach Pianese (ibid. p. 345) und nach Bremer (Arch. Mikr. Anat. 45. Bd. 1895 p. 446).

315. Lichtgrün S. F. Ein saurer Farbstoff im Sinne von Ehrlich, löslich in Wasser oder Alkohol, werthvoll als Plasmafarbstoff. Benda (Arch. Anat. Phys. Phys. Abth. f. 1891 p. 549; Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1892 p. 516) färbt Schnitte durch Hoden von Säugethieren 24 Stunden in Safranin, darauf $^1/_2$ Minute in Lichtgrün (oder **Säureviolett)** 1 g auf 400 ccm Alkohol, entwässert sie und schliesst sie in Balsam ein. Chromatin roth, Archoplasma hellgrün (oder violett) u. s. w. Ich habe dies auch probirt und finde,

die Färbung ist sehr schön. Das Säureviolett giebt vielleicht brillantere Farben und scheint auch, da man es etwas länger wirken lassen darf als das Lichtgrün, bequemer anwendbar zu sein. Jedenfalls ist aber die Methode nicht leicht und erfordert sehr dünne Schnitte. Leider hält sich das Lichtgrün nicht sehr lange: meine Präparate sind in Zeit von 2 Jahren beträchtlich blasser geworden.

316. Malachitgrün (Solidgrün, Viktoriagrün, Neugrün, Benzoylgrün, Echtgrün). Ein basischer Farbstoff, von van Beneden & Neyt für die Eier von *Ascaris* mit Einschluss in Glycerin benutzt (§ 635). Ich habe die Präparate vergeblich in Balsam zu bringen versucht: die Farbe widersteht dem Alkohol nicht.

317. Jodgrün (Hofmanns Grün) nach Griesbach (Z. Anzeiger 5. Jahrg. 1882 p. 406). Färbt im Wesentlichen wie Methylgrün, ist aber oft stark mit einem violetten Farbstoff verunreinigt und färbt dann das Plasma violett (Mayer in: Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p. 311).

318. Thiophengrün nach W. Krause (Internation. Monatschr. Anat. Phys. 4. Bd. 1887 p. 73).

319. Anilingrün soll nach Schiefferdecker (Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 51 u. 223) und nach List (ibid. p. 222) besonders gut den Schleim färben, aber schon damals müssen Differenzen in der Art des Farbstoffes bestanden haben, und gegenwärtig ist es wohl kaum noch möglich, seine richtige Benennung zu ermitteln.

320. Chinolinblau (Cyanin) nach Ranvier (Traité 1. Ed. p. 102). Es soll Fett intensiv blau färben. Certes hat es zum Färben von Infusorien intra vitam benutzt (§ 876).

321. Induline und Nigrosine. Die **Induline** sind entweder saure oder basische Farbstoffe (im Sinne Ehrlichs), die im Handel vorkommenden löslichen gewöhnlich sauer (Alkalisalze der Sulfosäuren). Sie gehen im Handel als **Indulin, Nigrosin, Indigen, Coupiers Blau, Echtblau R oder B, Blackley Blue, Guernsay Blue** u. s. w.

Nach Calberla (Morph. Jahrb. 3. Bd. 1877 p. 627) färbt man mit der konzentrirten wässerigen Lösung von **Indulin,** die mit dem Sechsfachen an Wasser verdünnt worden ist, Schnitte 5—20 Minuten lang, wäscht sie in Wasser oder Alkohol aus und studirt sie in Glycerin oder Nelkenöl. Die Kerne färbt es nie, wohl aber das Plasma und die Intercellularsubstanzen. Im Allgemeinen gleicht es hierin dem Chinolinblau und bildet den Gegensatz zum Methylgrün. So weit ich es nachgeprüft habe, scheint mir Calberla Recht zu haben, aber ich sehe keinen besonderen Nutzen davon.

Nigrosin färbt an Material aus Sublimat Kerne und Plasma, besonders stark aber jene (§ 281); für Material aus Chromosmiumsäure taugt es gar nicht.

322. Gemisch C von Ehrlich (Gemisch für **eosinophile Zellen, acidophiles Gemisch).** Nach der mir von Grübler angegebenen Formel löst man je 2 g Indulin, Aurantia und Eosin in 30 g Glycerin; entweder

lässt man auf der dicken Lösung die Deckglas-Präparate schwimmen oder giebt einige Tropfen auf die Schnitte und lässt den Objektträger horizontal liegen, bis die Färbung gut ist (bei Material aus Flemmings Gemisch 24 Stunden lang). Ehrlich hat sie für Leucocyten erdacht, Nikiforoff (Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 189; 11. Bd. 1894 p. 246) auf Schnitte angewandt. Ich finde, sie ist gut dafür; Material aus Flemmings Gemisch färbt sich kräftig damit, und die Farbe hält sich im Alkohol viel besser als die mit Ehrlich-Biondis Gemisch, taugt also für gewöhnliche Untersuchungen mehr. Meine Objekte färben sich im Allgemeinen wie mit Hämateïn-Thonerde (die Kerne dunkelblau, das Plasma hellblau, wo es nicht das Aurantia oder Eosin aufgenommen hat). Das Indulin wirkt also hier ganz anders, als wenn es allein ist (§ 321). Die Färbung soll sich gut halten.

Israel (Praktik. Path. Hist. 2. Aufl. Berlin 1893 p. 68) giebt eine komplizirte Art der Bereitung nach mündlicher Mittheilung von Ehrlich an.

323. Dreifarbengemisch von Groberg (Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1897 p. 460): Bordeaux R, Thionin und Methylgrün.

324. Safranin und Indigkarmin oder **Safranin und Nigrosin,** beide nach Kossinski (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1880 p. 61).

325. Anilinblau. Hierher gehören mehrere Derivate des Rosanilins, die im Handel als **Spritblau, Gentianablau 6 B, Opalblau, Bleu de nuit, Bleu lumière, Parmablau** und **Bleu de Lyon** gehen. Die Vorschriften älterer Forscher zum Färben mit Anilinblau kann man, denke ich, ausser Acht lassen, denn es wird kaum noch möglich sein, die damals benutzten Farbstoffe zu bekommen oder auch nur zu ermitteln, was sie eigentlich gewesen sind.

Die einzige von den oben genannten Farben, die ich selber kenne, oder die wirklich gut zu sein scheint, ist **Bleu de Lyon.** (Man giebt auch wohl Bleu de Nuit und Grünlichblau als Synonyma dazu an.) Ich finde zwar nichts Spezifisches darin, aber ein sehr guter Plasmafarbstoff ist es doch. Allerdings in starker Lösung färbt es das Chromatin, in schwacher dagegen zunächst das Plasma, und so ist es nach Kernfarbstoffen wie Karmin oder Safranin gut zu brauchen. Ferner differenzirt es Nerven und Knorpel sehr gut (schon von Baumgarten und Jacoby erwähnt). Früher färbte man damit Stücke in sehr schwacher alkoholischer Lösung nach Boraxkarmin durch (Maurice & Schulgin), Baumgarten und Jacoby färben die Schnitte in einer $^1/_5$ $^0/_0$igen alkoholischen Lösung (§ 342). Ich habe es mit Safranin (als

Kernfarbstoff) angewandt und einige hübsche Resultate erzielt, möchte aber diese Kombination doch nicht empfehlen, da beide sich gegenseitig leicht ausziehen. Die Färbung ist auch etwas undurchsichtig und scheint mir nicht so zart zu sein wie die mit Wasserblau (§ 326).

Anilinblau und Safranin. Garbini (Z. Anzeiger 9. Jahrg. 1886 p. 27) färbt Schnitte zuerst 1--4 Minuten lang mit einer Lösung von 1 Theil Anilinblau in 100 Theilen Wasser (unter Zusatz von 1—2 ccm absol. Alkohol), wäscht sie mit Wasser ab, entfärbt sie beinahe in 1%iger Lösung von Ammoniak in destill. Wasser, bringt sie auf 5—10 Minuten in ½%ige Salzsäure, wieder in Wasser, dann auf höchstens 10 Minuten in Pfitzners Safranin (§ 278), endlich durch absol. Alkohol zur Differenzirung in Nelkenöl und von da durch Xylol in Balsam.

326. Methylblau. Hierher gehören einige andere Derivate des Rosanilins. Es sind saure Farbstoffe (meistens Natronsalze von Trisulfosäuren); im Handel gehen sie als **Methylblau, Baumwollblau, Wasserblau, Methylwasserblau, Chinablau, lösliches Blau.**

Das **Wasserblau** hat einige sehr gute Eigenschaften. Nach Mitrophanow (Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 513) giebt es in konzentrirter Lösung eine sehr gute Doppelfärbung mit Safranin. Es hält sich in Alkohol sehr gut. Ich habe mit ihm und Safranin einige interessante Resultate erzielt, und da es sehr leicht zu verwenden ist, so lässt es sich wohl empfehlen. Aber man nehme es stets vor dem Safranin, sonst zieht es dieses rasch aus. Für Material aus Flemmings Gemisch sind 12—24 Stunden im Blau und 4—5 im Safranin wohl nicht zu viel. Mann (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 490) verwendet es in etwas komplizirter Weise mit Eosin zum Färben von Ganglienzellen.

327. Anilin Blue-Black. Dieses haben Bevan Lewis und Andere zum Färben von Nervengewebe empfohlen, geben aber leider nichts Genaueres über seine chemische Konstitution an. Ich weiss daher nicht, ob sie das **Blauschwarz B** oder das **Anilinschwarz** von Lightfoot meinen, das auch als **Nigranilin** und **Noir Colin** bekannt ist. Grübler schreibt mir, sein Blue-Black sei das Blauschwarz B, früher auch Azoschwarz (aus der Badischen Anilinfabrik) genannt; das Nigranilin und Noir Colin seien nicht mehr im Handel.

328. Karminblau (von den Höchster Farbwerken). Nach Janssens (La Cellule Tome 9 1893 p. 9) zeigt es besondere Verwandtschaft zu den Theilen des Zellplasmas, die sich zur Cuticula differenziren. Er braucht es in angesäuerter alkoholischer Lösung. Es hält sich in Balsam.

329. Methylviolett B oder **Violett B** (von Bindschedler & Busch in Basel und der Berliner Aktiengesellschaft für Anilinfabrikation). S. Mayer (Sitz. Ber. Akad. Wien 85. Bd. 3. Abth. 1882 p. 69) wendet es in einer ½%igen Lösung in ½%igem Salzwasser an, aber auf frische Gewebe; die Blutgefässe

treten dadurch so hervor, dass günstige Objekte, z. B. seröse Membranen, wie injizirt aussehen. Die Färbung lässt sich nach S. Mayer (Anat. Anzeiger 7. Jahrg. 1892 p. 221) durch Einschluss der Präparate in Glycerin mit Ammoniumpikrat (§ 293) einigermaassen konserviren. — Ueber **Säureviolett** s. § 315.

330. **Benzoazurin** ist nach Zschokke (Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 468) und Martin (ibid. 6. Bd. 1889 p. 193) je nach der Behandlung ein Plasma- oder ein Kernfarbstoff.

331. **Fuchsin und Methylenblau** nach Baumgarten (Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 315). Schnitte von Material aus Chromgemischen werden 24 Stunden in Fuchsin (8—10 Tropfen der konzentrirten alkoholischen Lösung auf ein Uhrglas voll Wasser) gefärbt, mit Alkohol abgespült, dann 4—5 Minuten in einer konzentrirten wässerigen Lösung von Methylenblau gefärbt, mit Alkohol 5—10 Minuten ausgewaschen und durch Nelkenöl in Balsam gebracht. Kerne roth, das übrige Gewebe blau (das Methylenblau hat das Fuchsin vertrieben, was Alkohol allein, ob neutral oder sauer, nicht vermag).

332. **Künstliches Alizarin** nach Rawitz (Anat. Anzeiger 11. Jahrg. 1895 p. 294). Rawitz hat eine Methode für eine Doppelfärbung mit künstlichem Alizarin oder mit Alizarincyanin ausgearbeitet; diese erfordert aber spezielle Beizen, die man von den Verfertigern der Farbstoffe selber beziehen muss, ist äusserst komplizirt und kostet wenigstens mehrere Tage Zeit. Da mir die Resultate (nach der Beschreibung von Rawitz zu urtheilen) durchaus nicht denen überlegen zu sein scheinen, die man auf die gewöhnliche Art durch successive oder kombinirte Anwendung von zwei oder mehr Farbstoffen in $^1/_2$ Stunde erzielen kann, so ist die Methode wohl überflüssig.

333. **Adjektive Plasmafärbung.** Rawitz hat gefunden, dass durch geeignete Beizen die Theerfarbstoffe, die für sich regressiv reine Kernfärbungen geben, zu reinen Plasmafarbstoffen werden. Schnitte von Material aus Chromgemischen (Flemmings Gemisch etc.; ich finde, Hermanns Gemisch leistet es auch) kommen auf 24 Stunden in eine kalt bereitete 20%ige Lösung von Tannin in Wasser, werden dann gewaschen, in eine 1—2 $^1/_2$ %ige Lösung von Brechweinstein gelegt (auf 2—3 Stunden bei 37° C. oder auf 24 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur), sorgfältig gewaschen, 24 Stunden lang gefärbt, dann differenzirt (entweder wie sonst auch in Alkohol oder 2—24 Stunden lang in einer 2 $^1/_2$ %igen Lösung von Tannin) und zuletzt wie gewöhnlich in Balsam gebracht. Zum Färben können dienen Safranin, Fuchsin, Methylviolett, Gentianaviolett oder Smaragdgrün. In guten Präparaten zeigt sich eine Inversion der Farbe: das Chromatin ist ganz ungefärbt, dagegen sind Plasma und Intercellularsubstanzen gefärbt.

Die Angaben von Rawitz (Sitz. Ber. Ges. Nat. Freunde Berlin f. 1894 p. 174; Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1895 p. 503; sein Leitfaden 2. Auflage 1895 p. 76) genügen nicht. Rawitz hatte damals ausschliesslich mit Hoden von *Salamandra* gearbeitet. Ich finde aber, je nach den Objekten variiren die Resultate ganz

bedeutend. So habe ich, um echte Inversion zu erzielen, die Bäder viel kürzer verwenden müssen, namentlich das Färbbad; auch ist mir die reine Inversion nur bei Hoden geglückt, während andere Schnitte oft durch und durch so intensiv gefärbt waren, dass man gar nichts mehr unterschied. Endlich scheinen mir die Gewebe nicht wenig dabei gelitten zu haben. Jedenfalls ist die Färbung so schmutzig wie nur möglich. Viele Präparate haben gar keine Inversion ergeben. So betrachte ich denn die Methode von Rawitz mehr als eine sehr interessante technische Kuriosität (s. auch § 214).

---

17. Kapitel.

Färben mit anderen organischen Farbstoffen; Doppelfärbungen.

334. Kernschwarz. Nach Platner (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 350) ist es eine schwarze Flüssigkeit von unbekannter Zusammensetzung, die aus Russland stammt.[1]) Sie ist bei Grübler & Hollborn zu haben. Man färbt die Schnitte (und nur diese!) mit ziemlich stark verdünntem Kernschwarz und wäscht sie (mehrere Stunden lang) in einem wässerigen Alkali, etwa in verdünntem Ammoniak, besser aber noch in einer Lösung von Lithiumkarbonat (die konzentrirte Lösung mit 3 oder mehr Volumen Wasser vermischt). Die Mitosen werden ganz tief gefärbt, die ruhenden Kerne blasser oder gar nicht, das Zellplasma gar nicht oder nur schwach grau.

Platner empfahl dies Kernschwarz eigentlich als Kernfarbstoff. Indessen habe ich schon in den früheren Auflagen dieses Buches gesagt, dass es als solcher gar nicht besonders hervorrage, halte es dagegen für den nützlichsten Plasmafarbstoff, den ich kenne. Freilich nicht für den schönsten, denn sein nüchternes Neutralgrau ist ästhetisch nicht verführerisch. Ich verwende es wie folgt.

---

[1]) Aus Platners Arbeit scheint hervorzugehen, dass der Name Kernschwarz von Platner selbst herrühre; jedoch hat Grübler, wie er uns mittheilt, das Kernschwarz bereits unter diesem Namen von einem russischen Chemiker eigens für mikroskopische Zwecke angeboten erhalten. (Immerhin ist das Kernschwarz des Handels eine ganz andere Substanz.) Platner giebt an, nach Grübler sei es eine Metallbase in Verbindung mit einer organischen Säure. Ich finde, diese Metallbase ist einfach Eisen (5 ccm Kernschwarz lieferten mir etwa 0,1 g Eisenoxyd; ausserdem ist Schwefelsäure vorhanden), und die organische Säure dürfte irgend ein Gerbstoff sein. Man kann daher auch die Ueberfärbung durch Ausziehen mit saurem Alkohol beseitigen. Aehnliche, allerdings nicht so scharfe Färbungen habe ich durch Gallussäure in Verbindung mit Eisenchlorid oder Eisenoxydsulfat erhalten. [M.]

Die aufgeklebten Schnitte von Material aus Chromosmiumsäure (das aus Sublimat giebt keine guten Resultate) werden so lange mit Kernschwarz behandelt, bis sie gelblich grau sind. Von erst kürzlich konservirtem Material sind sie schon nach einigen Minuten so weit, und nur in diesem Fall nimmt man wohl besser das Kernschwarz auf $^1/_{10}$ verdünnt, um nicht zu überfärben. Ist das Material hingegen mehrere Monate alt, so muss man 24 Stunden lang im unverdünnten Kernschwarz färben. Nun wasche ich die Schnitte, ohne sie erst mit dem Alkali zu differenziren, in Wasser ab, färbe sie 24 Stunden oder länger mit einem Kernfarbstoff (Safranin, aber Gentianaviolett, Viktoriablau oder Hämalaun etc. thun es auch), differenzire das Safranin mit Alkohol (saurem oder neutralem je nach Bedürfniss) und Nelkenöl und schliesse wie gewöhnlich in Harz ein. So resultirt eine nahezu reine Doppelfärbung. Wie ich schon anderswo erörtert habe (La Cellule Tome 11 1895 p. 31; 1896 p. 257), eignet sich diese Methode am besten von allen mir bekannten zum Studium der Spindelreste, aber ich habe sie auch für viele andere Gewebe ausgezeichnet gefunden und möchte sie, da sie ganz sicher und sehr leicht ist, als allgemein anwendbar empfehlen.

Die Färbungen mit Kernschwarz sollen sich gut zum Photographiren eignen.

335. Brasilin, das wirksame Prinzip des Roth- oder Fernambukholzes, das dem Hämatoxylin des Blauholzes entspricht und sich, wie dieses sich zu Hämateïn, zu Brasileïn oxydirt, wird von Eisen (Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 198) warm empfohlen.[1]) Es soll „be mixed as Böhmer's Haematoxylin", wird gleich diesem erst nach einigen Wochen gebrauchfähig und verdirbt ebenfalls sehr rasch durch Bildung eines Niederschlages. Dieser aber eigne sich nach Auflösung in Alkohol von 95 % (mit 15 oder mehr % Glycerin) noch viel besser zum Färben. — Ueber Rothholz zum Färben des Nervensystems s. § 714.

336. Orceïn nach Israel (Arch. Path. Anat. 105. Bd. 1886 p. 169; Praktik. Path. Hist. 2. Aufl. Berlin 1893 p. 72). Orceïn wird aus der Flechte Lecanora parella gewonnen und ist nicht zu verwechseln mit Orcin, das von derselben Pflanze stammt. Es soll die färberischen Eigenschaften eines sauren und eines basischen Farbstoffs vereinigen und auch die Verbindung von zwei Kontrastfarben bilden. Israel färbt Schnitte mit einer Lösung von 1 g Orceïn in 1 g Eisessig und 50 ccm Wasser, wäscht sie in Wasser ab und bringt sie rasch durch absoluten

---

[1]) Nach meinen oft variirten Versuchen, die ich schon seit Jahren immer wieder aufgenommen habe, färbt das Brasilin in Verbindung mit Alaun zwar ähnlich, aber lange nicht so intensiv wie Hämalaun oder Karmalaun, ist daher wenigstens als Kernfärbmittel entbehrlich. [M.]

Alkohol in dickes Cedernöl, worin die Präparate definitiv eingeschlossen bleiben. Kerne blau, Plasma roth. — Die Methoden zur Färbung von Bindegewebe mit Orceïn s. § 792; über die **Orseille** nach Wedl (Arch. Path. Anat. 74. Bd. 1878 p. 143) s. die früheren englischen Auflagen dieses Buches und Fols Lehrbuch p. 192.

So weit ich sehen kann, hat der Farbstoff für gewöhnliche Untersuchungen wohl kaum eine Zukunft. Ich habe mit der Essigsäure keine gute Lösung erhalten. Eine 1%ige Lösung in absolutem Alkohol hat mir an Material aus Flemmings Gemisch das Plasma schwach gefärbt, dagegen traten die Nebenkerne gut hervor, und zum Studium von diesen mag der Farbstoff vielleicht dienen.

337. Purpurin nach Ranvier (Traité techn. 1. Bd. p. 280; Duval. Précis Techn. hist. p. 221) und nach Grenacher (Arch. Mikr. Anat. 16. Bd. 1879 p. 470).

338. Indigo. Er wird in der Mikrotechnik in der Form von Lösungen des käuflichen Indigkarmins, d. h. des Natrium- oder Kaliumindigsulfats angewandt. Die einfachen wässerigen Lösungen färben diffus und taugen daher allein nicht, wohl aber in Verbindung mit Karmin zur Doppelfärbung (s. § 339—341). Mit Safranin habe ich es vergebens angewandt, s. jedoch § 324. Ueber Indigkarmin und Oxalsäure nach Thiersch s. Arch. Mikr. Anat. 1. Bd. 1865 p. 150.

Karmin mit anderen Farbstoffen.

339. Karmin und Indigkarmin nach Seiler (Amer. Q. Micr. Journ. Vol. 1 1879 p. 220; Journ. R. Micr. Soc. London Vol. 2 1879 p. 613). Man färbt mit Boraxkarmin, differenzirt in saurem Alkohol, wäscht gut mit neutralem Alkohol aus und färbt mit einer äusserst schwachen alkoholischen Lösung von Indigkarmin (2 Tropfen einer gesättigten wässerigen Lösung auf 30 ccm Alkohol) nach. Ich finde diese Methode gut für Schnitte, durchaus aber nicht für Stücke, denn das Indigkarmin überfärbt aussen, bevor es in die Tiefe dringt. Seilers Vorschrift bezieht sich auf Material aus Sublimat oder dergleichen; das aus Chromosmiumsäure hat sich mir gar nicht gefärbt.

340. Karmin und Indigkarmin nach Merkel (Unters. Anat. Inst. Rostock 1874; ferner Norris & Shakespeare in: Amer. Journ. Med. Sc. 1877; Bayerl in: Arch. Mikr. Anat. 23. Bd. 1885 p. 36; Macallum in: Trans. Canad. Inst. Vol. 2 1892 p. 222). Nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p. 320) ist die Vorschrift ganz irrationell, unpraktisch und giebt auch eine stark alkalische, mithin den Geweben schädliche Lösung. Ich bin mit ihm der Meinung, dass sie fortfallen muss.

341. Karmalaun (oder **Hämalaun) mit Indigkarmin** nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p. 320). Eine Lösung von 1 g Indigkarmin in 500 ccm Wasser (oder 5%iger Alaunlösung) wird mit dem 4—20fachen an Hämalaun oder Karmalaun vermischt angewandt. Das Indigkarmin färbt weder die Kerne noch den Schleim, wohl aber das Plasma und ist in Balsam haltbar. Die Lösung des Indigkarmins

hält sich bei grellem Lichte nur wenige Monate; dagegen ist die in Alkohol von 70% (1 : 200) Jahre lang haltbar.

342. Karmin und Anilinblau nach Duval (Précis Techn. micr. 1878 p. 225). Man färbt die Schnitte mit Karmin „wie gewöhnlich“, entwässert sie, färbt sie einige Minuten (Schnitte durch das Nervensystem 10 Minuten) lang mit einer verdünnten alkoholischen Lösung von Anilinblau (10 Tropfen der gesättigten Lösung auf 10 g absol. Alkohol) und überträgt sie dann durch Terpentinöl in Balsam.

Neuere Autoren empfehlen statt des Anilinblaus das **Bleu de Lyon**, das in Alkohol von 70% mit etwas Essigsäure gelöst wird (Maurice & Schulgin), oder das **Bleu lumière**, das kaum an die Kerne geht (§ 325). Beide Lösungen müssen für Material aus Sublimat äusserst schwach, hingegen für das aus Chromosmiumsäure stark sein. Man kann auch damit Stücke färben.

Baumgarten (Arch. Mikr. Anat. 40. Bd. 1892 p. 512) färbt Schnitte von Knorpel und Nervensystem (nach der Stückfärbung mit Boraxkarmin) 12 Stunden lang mit einer $^1/_5$ %igen Lösung von Bleu de Lyon in absolutem Alkohol, wäscht sie 6 Stunden lang aus und bringt sie dann in Balsam.

343. Karmin und Malachitgrün nach Maas (Zeit. Wiss. Z. 50. Bd. 1890 p. 530): Boraxkarmin, dann Malachitgrün in schwacher alkoholischer Lösung, Auswaschen in stärkerem Alkohol; s. auch § 316.

344. Karmin und Pikro-Nigrosin nach Pianese (Journ. R. Micr. Soc. London f. 1892 p. 292). — **Karmin und Pikrinsäure** s. § 299.

Hämateïnthonerde mit anderen Farbstoffen.

345. Pikrokarmin und Hämateïnthonerde. Kathariner (Z. Jahrb. Abth. Morph. 10. Bd. 1897 p. 58) färbt die Schnitte durch den entkalkten Oberkiefer von Giftschlangen erst gut mit Pikrokarmin, wäscht sie aus und färbt sie dann einige Minuten lang mit verdünntem Gemisch von Delafield: an den Zähnen das unverkalkte Dentin roth, das verkalkte blau, etc.

346. Hämateïnthonerde und Pikrinsäure. S. § 299.

347. Hämateïnthonerde und Eosin. Eine sehr gebräuchliche Kombination, der allerdings einige Mikroskopiker die mit **Benzopurpurin** (§ 309) vorziehen. Man färbt zuerst die Stücke oder die Objekte mit Hämateïnthonerde (z. B. Hämalaun) und dann die Schnitte noch

einige Minuten lang in einer schwachen wässerigen oder alkoholischen Lösung von Eosin. (Stöhr in: Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 583) verwendet es in konzentrirter Lösung.) Hickson (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 35 1893 p. 129) färbt hingegen die Schnitte zuerst in einer starken Lösung von Eosin in 90 %igem Alkohol, wäscht sie mit Alkohol und bringt sie dann in die Hämateïnthonerde.

Diese Methode eignet sich besonders für Embryonen, da der Dotter das Eosin energisch aufnimmt, während in den Geweben des Embryos das Blau vorherrscht. S. auch List (Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 148), Busch (Arch. Anat. Phys. Phys. Abth. f. 1878 p. 594) und Gierke (Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 505).

Stets müssen die Schnitte vor dem Uebertragen aus der einen Färblösung in die andere gut ausgewaschen werden, da sonst leicht Niederschläge entstehen.

Zu seiner Kombination von Hämateïnthonerde und Eosin hat Renaut nach und nach immer neue Formeln gegeben; die letzte steht in Fols Lehrbuch p. 196. Sie zeichnen sich alle durch Komplikation der Bereitung und Anwendung aus; das Wesentliche dabei ist, dass die Lösung ungemein viel Glycerin enthält, sodass die Gewebe oft erst nach Wochen stark genug gefärbt sind.

Everard, Demoor & Massart (Ann. Inst. Pasteur Tome 7 1893 p. 166) lösen 30 g Alaun in 300 ccm heissem Wasser, filtriren und geben 24 Stunden später 1½ g Hämatoxylin (in 15 ccm Alkohol gelöst) hinzu. Nach 8 Tagen wird wieder filtrirt und eine Lösung von 2 g Eosin in 50 ccm Alkohol, 150 Wasser und 100 Glycerin zugesetzt.

348. Hämateïnthonerde und Congoroth. Carnoy & Lebrun (La Cellule Tome 12 1897 p. 216) empfehlen eine Doppelfärbung der Schnitte durch Eier von Batrachiern mit Hämateïnthonerde und nachher Congoroth (1:200 Wasser), das nur die Kerne nicht färbt. Die Präparate seien in Kolophonium haltbar.

Nach Böhm & Oppel (Taschenbuch 3. Aufl. 1896 p. 155) hat Stintzing im Magen der Säugethiere mit Häm. und Congoroth die Hauptzellen bläulich, die Belegzellen roth gefärbt erhalten; ferner hat er im Bindegewebe des Magens von *Sus* durch Auswaschen des Congoroths erst mit Alkohol von 100, dann von 70 % „congophile Zellen" entdeckt, die wohl mit Ehrlichs eosinophilen Zellen identisch sind.

349. Hämalaun und Säurefuchsin. Nach guter Kernfärbung mit Hämalaun färbt man die Schnitte 5—10 Minuten lang mit einer ½ %igen wässerigen Lösung von Säurefuchsin, entwässert sie und bringt sie in Balsam. Ich empfehle diese Methode aber nicht für Material aus Flemmings Gemisch.

350. Hämalaun und Säurefuchsin mit Orange nach Squire (Methods p. 42). Man färbt mit Hämalaun, wie oben angegeben, dann aber

bringt man die Schnitte in eine Lösung von 1 g Säurefuchsin und 6 g Orange G in 60 ccm Alkohol und 240 ccm Wasser. Dies halte ich für eine sehr gute Kombination. Zehn Minuten sind für Material aus Sublimat wohl zu viel, aber für das aus Flemmings Gemisch nicht genug. — Die Methode von Cavazzani (Riforma Med. Napoli 1893 p. 604; Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 344) ist gar komplizirt.

351. Hämateïnthonerde und Safranin nach Rabl (Morph. Jahrb. 10. Bd. 1884 p. 215). Hier wirkt das Safranin als Kernfarbstoff, die Hämateïnthonerde hingegen färbt das Plasma. Man färbt zuerst mit letzterer (Rabl verwendet sehr verdünntes Gemisch von Delafield 24 Stunden lang) so hell, dass die Farbe allein gar nicht zu brauchen wäre, wäscht mit Wasser, dann mit saurem Alkohol, färbt mehrere Stunden lang in Pfitzners Safranin (§ 278) und wäscht mit neutralem Alkohol aus.

Foà (Festschr. Virchow 1891 p. 481; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 227) kombinirt zur Untersuchung von Knochenmark beide Farbstoffe wie folgt: Böhmers Hämatoxylin 25 ccm, Safranin (die gewöhnliche 1%ige Lösung in Alkohol und Wasser) 20 ccm, Wasser 100 ccm. Er färbt die Schnitte darin 1—3 Minuten lang, wäscht sie dann aus und entwässert sie entweder sofort oder färbt sie erst noch mit einer schwachen Lösung von Pikrinsäure (oder auch von Orange).

18. Kapitel.

Färben mit Metallen ohne eigentliche Farbstoffe. Imprägnation.

352. Charakter der Imprägnirfärbungen. Unter Imprägnation versteht man die Art der Färbung, bei der die Färbmaterie in den Gewebselementen als ein körniges Präcipitat abgelagert wird, so dass die imprägnirten Gewebe undurchsichtig werden. Unter Tinktion versteht man hingegen die Färbung, bei der die Färbmaterie von den Geweben wie gelöst zurückgehalten wird, mithin unter dem Mikroskop keine soliden Partikeln zeigt, sodass die Gewebe durchsichtig bleiben. Indessen lässt sich, wie ausdrücklich bemerkt sein mag, zwischen diesen beiden Arten keine scharfe Grenze ziehen: mehrere von den hier zu erörternden Metallsalzen geben ausser Imprägnationen in einigen Fällen eine echte Tinktion (§ 376); umgekehrt liefern etliche der früher behandelten Farbstoffe ausser einer Tinktion eine echte Imprägnation. So giebt z. B. Methylenblau in ein und demselben Präparate beides, und ebenso zeigt die kritische Durchmusterung von wirklich guten Goldpräparaten, dass die Farbe an manchen Stellen ein feines solides Präcipitat, an anderen wieder eine völlig durchsichtige Tinktion ist. So ist denn auch der Doppeltitel dieses Kapitels gerechtfertigt.

353. Negative und positive Imprägnationen. Bei einer negativen Imprägnation sind lediglich die Intercellularsubstanzen gefärbt, die Zellen hingegen gar nicht oder nur schwach; bei einer positiven ist das Umgekehrte der Fall. (Diese Erklärung ist um so nothwendiger, als in einem modernen Lehrbuch genau das Gegentheil gesagt wird.) Allgemein wird angenommen, dass die negative primär ist, da sie direkt durch die Reduktion des Metalles in den Intercellularräumen bewirkt wird; die positive sekundär (wenigstens beim Silber), denn

sie kommt dadurch zu Stande, dass sich der metallische Niederschlag einer primären Imprägnation in den Gewebssäften wieder löst, und nun diese neue Metalllösung die Zellen färbt. Die sekundären greifen Platz, wenn die Reduktion des Metalls bei der primären nicht kräftig genug ist (s. His in: Schweizer Zeit. Heilk. 2. Bd. 1862 p. 1; Gierke in: Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 393; Ranvier, Traité 1. Ed. p. 107).

354. Wirkung des Lichtes auf die Lösungen von Metallsalzen. Man hält die Lösungen von Metallsalzen gewöhnlich im Dunkeln oder wenigstens in farbigen Flaschen, da man glaubt, dass das Licht sie durch Reduktion des Metalls verderbe. Oben p. 23 ist aber bereits gezeigt worden, dass wenigstens die Osmiumsäure nicht durch das Licht, sondern den Staub reduzirt wird, sodass man sie unbeschadet jenem aussetzen kann, wenn nur diesem absolut der Zugang verwehrt wird. Ich kann nun auch mit guten Gründen dasselbe von anderen Metallsalzen darlegen, und es entsteht sogar die interessante Frage, ob solche Lösungen nicht für die Imprägnirungen positiv besser werden, wenn man sie dem Licht aussetzt. Dr. Lindsay Johnson hat nämlich diese Frage als Histologe und Photograph untersucht und schreibt mir darüber wie folgt: „Wie ich experimentell festgestellt habe, gilt als Regel ohne Ausnahme, dass alle Lösungen von salzsauren oder salpetersauren Metallsalzen sich in reinen, weissen, gut geschlossenen Flaschen am Sonnenlichte unbegrenzt lange halten und, so weit Osmium, Uranium, Gold, Silber und Platin in Betracht kommen, durch gute Besonnung wirklich besser werden oder reifen. Alle Photographen sagen mir, ihr Papier versilbere sich gleichmässiger bei Behandlung mit alter, gut besonnter Lösung von Höllenstein als mit frischer, im Dunkeln gehaltener; und ich möchte daher sogar glauben, dass dies einer der Gründe ist, warum Goldlösungen so wenig zufrieden stellen.“ Ich selbst habe keine Experimente zur Bestätigung dieser Hypothese angestellt, halte sie aber für sehr plausibel und noch genauerer Untersuchung werth. Auch Apáthy (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1897 p. 722) lässt seine Goldlösung am Licht stehen, so lange kein Objekt darin ist.

355. Beschaffenheit der Gewebe. Während bekanntlich die meisten Tinktionen nicht an frischen, sondern an konservirten, d. h. mit Metallsalzen beladenen oder sonst veränderten Geweben ausgeführt werden, imprägniren sich die ganz frischen, d. h. solche, die noch leben oder wenigstens mit keinem Reagens behandelt worden sind,

im Allgemeinen am leichtesten und besten. Ja, die meisten Imprägnationen gerathen überhaupt nicht mit Geweben, die nicht in dem eben angegebenen Sinne frisch sind.

Silber.

356. Allgemeines über Silbernitrat (Höllenstein). Von allen Silbersalzen wird dieses am meisten angewandt. Ich folge hier den Auseinandersetzungen von Ranvier (Traité 1. Ed. p. 105) als den besten, die wir haben.

Der Höllenstein wird entweder in Lösung oder fest angewandt. Fest braucht man ihn zwar seltener, aber das Versilbern geht damit leicht und ergiebt gute Resultate; für Epithelien taugt er nicht, wohl aber für die Cornea und für fibröses Gewebe. Man nimmt das Auge heraus, fährt rasch mit einem Stück Höllenstein über die Cornea, trennt sie dann los, legt sie in Wasser, reibt mit einem Pinsel das Epithel ab und setzt sie nun dem Licht aus; später zeigt sich, dass sich in der Flüssigkeit auf der Cornea etwas Höllenstein gelöst hat, durch das Epithel hindurch in das Fasergewebe gedrungen ist und sich auf diesem durch das Licht reduzirt hat, während die Zellen ungefärbt geblieben sind. — Die Lösung macht man 1 % stark, verdünnt sie aber je nachdem mit dem 2—4 fachen Volumen Wasser; ihre Anwendung variirt je nach den Umständen in den Einzelheiten, und dies ist sehr wichtig. Eine Membran z. B., wie das Epiploon, muss man wie ein Trommelfell über ein Porzellangefäss ausspannen und zuerst mit destillirtem Wasser abwaschen, um die Albuminate und das Blut zu entfernen, darauf mit der Höllenstein-Lösung behandeln, und zwar in direktem Sonnenlicht oder wenigstens bei grosser Helle, sonst kommt es zu keiner starken Färbung. Sobald nun die Membran weiss geworden ist und gerade schwärzlich-grau zu werden anfängt, wäscht man sie wieder mit Wasser ab und untersucht sie in einem passenden Medium. Nimmt man die Lösung zu schwach ($^1/_{500}$ bis $^1/_{1000}$), oder ist das Licht nicht kräftig genug, so resultirt eine allgemeine Färbung anstatt der interstitiellen: am stärksten sind dann die Kerne gefärbt, weniger das Plasma, noch weniger die Intercellularsubstanz. Im Allgemeinen treten bei einer guten Imprägnation die Zellen, besonders die Kerne, gar nicht hervor.

Ranvier macht ferner darauf aufmerksam, dass man die Gewebe beim Imprägniren im Silberbade immer bewegen müsse, sonst würden sich

darauf Präcipitate bilden und könnten zu Täuschungen führen. Nach der Imprägnation kann man mit Pikrokarmin (oder einem anderen Karmingemisch) die Kerne färben, falls jene nicht zu weit gegangen ist.

357. An Stelle der oben erwähnten Porzellangefässe verwendet man besser die sogenannten **histologischen Ringe von Hoggan.** Es sind ein Paar Ringe aus Hartgummi, die genau in einander passen, sodass man Membranen zwischen sie klemmen und ausspannen kann (s. Journ. R. Micr. Soc. London Vol. 2 1879 p. 357; Journ. Anat. Phys. Paris 15. Année 1879 p. 54). Neuerdings hat sie Eternod wieder erfunden (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 39); zu haben sind sie nach ihm in Genf bei Demaurex (Bandagiste, Fusterie).

358. Die gebräuchlichen Lösungen des Höllensteins. Ranvier gebraucht den Höllenstein meist in Lösungen von 1:300 (Epiploon, Lungenepithel, Knorpel, Sehne) bis 1:500 (Vaguscentrum, Darmepithel). Zur Injektion in Blutgefässe, um das Endothel zu imprägniren, nimmt er 1:500 bis 1:800. Duval (Précis p. 229) verwendet Lösungen von 1 bis höchstens 3 %, Recklinghausen (Lymphgefässe 1862 p. 5) für die Cornea 1:400 bis 500. Robinski (Arch. Phys. Paris 1869 p. 451) lässt Lösungen von 1:500 bis 1000 eine halbe Minute lang einwirken, Reich (Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 397) injizirt die Gefässe, um das Endothel zu untersuchen, mit 1:400 bis 600. Rouget (Arch. Phys. Paris 1873 p. 603) badet die Gewebe in 1:750 bis 1000 mehrere Male und wäscht sie dazwischen jedesmal mit Wasser ab. Die Hertwigs (Jena. Zeit. Naturw. 14. Bd. 1880 p. 324) verwenden für Seethiere 1:100, die Hoggans (Journ. Anat. Phys. London Vol. 15 1881 p. 477) für die Lymphgefässe dieselbe Stärke. Tourneux & Hermann (Journ. Anat. Phys. Paris 12. Année 1876 p. 200) lassen die Epithelien von Wirbellosen in 3:1000 und noch schwächeren Lösungen 1 Stunde lang und bringen sie dann gleich in Alkohol von 90 %.

Hoyer (Arch. Mikr. Anat. 12. Bd. 1876 p. 649) setzt zu einer Silberlösung von bekannter Stärke so viel Ammoniak, bis der Niederschlag sich gerade wieder löst, und verdünnt dann die Lösung, bis sie nur noch $^3/_4$—$^1/_2$ % Höllenstein enthält. Dieses Doppelsalz dient ihm hauptsächlich zur Injektion der Gefässe (wegen des Endothels), aber auch zur Imprägnation von Membranen durch einfaches Darübergiessen. Es imprägnirt ausschliesslich das Endothel oder Epithel, nicht auch das Bindegewebe, soll auch die Färbung schärfer machen als die gewöhnlichen Lösungen.

Dekhuizen (Anat. Anzeiger 4. Jahrg. 1889 p. 789) wäscht (ähnlich wie Harmer, s. § 362) das Mesenterium des Frosches erst mit einer

Lösung von Salpeter (13:1000), bringt es dann 3—6 Minuten lang in eine $^1/_4$ $^0/_0$ige Lösung von Höllenstein, die 3 $^0/_0$ Salpetersäure enthält, darauf in diese 3 $^0/_0$ige Säure, von hier durch Alkohol von 96 $^0/_0$ in Nelkenöl, wo sich das Silber bei diffusem Lichte in einigen Minuten reduzirt. Die Gewebe sollen ausgezeichnet konservirt sein und die Kerne sich mit Hämateïnthonerde, Safranin oder Methylgrün nachfärben lassen. Regaud endlich (Journ. Anat. Phys. Paris 30. Année 1894 p. 719; Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1895 p. 74) behandelt nach Renaut die Lymphgefässe mit einem Gemisch der Lösungen von Höllenstein, Pikrinsäure, Osmiumsäure und Essigsäure.

359. Andere Silbersalze. Alferow (Arch. Phys. Paris 1874; Duval, Précis p. 230) hat mit Silberpikrat, -lactat, -acetat und -citrat bessere Resultate erhalten als mit Höllenstein. Er verwendet die Salze in einer Lösung von 1:800, die mit ein wenig von der betreffenden Säure versetzt ist (auf 800 ccm 10—15 Tropfen der konzentrirten Säurelösung), damit sich keine Niederschläge von Silber mit den Chloriden, Karbonaten etc. in den Geweben bilden.

360. Reduktion des Höllensteins. Sie lässt sich auch in anderen Medien als nur in destillirtem Wasser bewirken.

Recklinghausen (Arch. Path. Anat. 19. Bd. 1860 p. 451) bringt die Präparate in schwaches Salzwasser, bevor er sie dem Licht aussetzt. Müller (ibid. 41. Bd. 1867 p. 120) imprägnirt sie 2—3 Minuten lang im Dunkeln mit einer 1 $^0/_0$igen Lösung von Höllenstein, setzt dann ein wenig von einer 1 $^0/_0$igen Lösung von Jodsilber (in Jodkalium und Wasser) hinzu, bewegt die Präparate darin hin und her, wäscht sie mit destill. Wasser ab und lässt sie wenigstens 2 Tage lang am Lichte in $^1/_{10}$ $^0/_0$ igem Höllenstein stehen.

Rouget (Arch. Phys. Paris 1873 p. 603) reduzirt in Glycerin, Sattler (Arch. Mikr. Anat. 21. Bd. 1882 p. 672) in Wasser mit etwas Essigsäure oder Ameisensäure; Thanhoffer (Mikroskop, 1880), der diese Methode empfiehlt, nimmt eine Essigsäure von 2 $^0/_0$.

Krauss bringt die Präparate nach dem Abwaschen in eine hellrothe Lösung von Kaliumhypermanganat; sie reduziren das Silber darin sehr rasch, selbst im Dunkeln, indessen nicht immer; Oppitz lässt 2—3 Minuten lang eine $^1/_4$—$^1/_2$ $^0/_0$ige Lösung von Zinnchlorid auf sie einwirken, und dann geht die Reduktion rasch vor sich (s. Gierke in: Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 400).

Jakimovitch (Journ. Anat. Phys. Paris 24. Année 1888 p. 150) überträgt die im Dunkeln versilberten Nerven, sobald sie in Wasser am Licht dunkelbraun geworden sind, auf 2—3 Tage in ein Gemisch von

100 Wasser, 1 Amylalkohol und 1 Ameisensäure. Sie werden darin am Licht anfänglich heller, weil etwas Silber gelöst wird, daher muss auch die Flüssigkeit ab und zu erneuert werden. Hat sich alles Silber gelöst, so bleibt in den Nerven eine dunklere Färbung zurück. Nervenzellen versilbert er 2 Tage lang und lässt sie dann 5—7 Tage in dem Säuregemisch.

361. Nachdunkeln. Legros (Journ. Anat. Phys. Paris 1868 p. 275) wäscht die Präparate nach der Reduktion mit Natriumhyposulfit, um das Nachdunkeln zu verhüten. Nach Duval (Précis p. 230) dürfen sie in einer 2 %igen Lösung nur wenige Sekunden bleiben und kommen dann in destillirtes Wasser.

362. Höllenstein bei Seethieren. Wegen der vielen Chloride in in ihren Geweben können die Seethiere nicht direkt mit Höllenstein behandelt werden. R. Hertwig (Jena. Zeit. Naturw. 14. Bd. 1880 p. 324) fixirt sie daher erst mit ein wenig Osmiumsäure, wäscht sie dann mit destillirtem Wasser so lange, bis dieses mit Höllenstein nur noch ein unbedeutendes Präcipitat giebt, und behandelt sie nun erst 6 Minuten mit 1 %igem Höllenstein. Harmer (Mitth. Z. Stat. Neapel 5. Bd. 1884 p. 445) wäscht sie in einer 5 %igen Lösung von Salpeter und behandelt sie dann wie gewöhnlich mit Höllenstein. Diese Methode ist gut für allerlei kleine Seethiere (Bryozoen, Medusen, Hydroiden, *Sagitta, Appendicularia),* auch für Schwämme, Anneliden, Fischeier. Eine $4\frac{1}{2}$ %ige Lösung von Natriumsulfat kann mitunter an die Stelle des Salpeters treten. (S. auch oben p. 212 die Methode von Dekhuizen.)

363. Imprägnation des Nervensystems. Hierüber, besonders über die Methode von Golgi, s. Kapitel 30.

364. Doppelfärbung der Objekte nach der Versilberung. Die Kerne lassen sich wie gewöhnlich färben, nur dürfen die Färbgemische kein freies Ammoniak enthalten, da sonst das Silber sich wieder löst. Auch sind dazu nur negative Imprägnationen verwendbar, denn falls die Kerne selber Silber enthalten, so nehmen sie keine Farbe mehr an.

Auch Gold lässt sich nach Silber imprägniren, setzt sich jedoch einfach an dessen Stelle und liefert mithin keine eigentliche Doppelfärbung (s. § 366).

365. Art des metallischen Niederschlages. Es besteht noch beträchtliche Unklarheit über die Natur des braunen oder schwarzen Niederschlages, den das Silbersalz bei primärer Imprägnirung in den Intercellularräumen hervor-

bringt. Nach Recklinghausen bildet es nämlich mit der hypothetischen Kittsubstanz eine Verbindung, die am Licht schwarz wird; Andere glauben nicht an diese Substanz und halten die farbigen Linien entweder für die gefärbten Zellmembranen oder lassen sich das Metallsalz mit der albuminösen und salzigen Flüssigkeit um die Zellen verbinden und so in einfachen Intercellularräumen niederschlagen. Schwalbe (Arch. Mikr. Anat. 6. Bd. 1870 p. 5) möchte zwei Fälle unterscheiden: die schwarzen Linien kommen durch die sehr kurze Wirkung sehr dünner Lösungen zu Stande und beruhen auf einem echten Niederschlage, d. h. dem in den Intercellularräumen reduzirten Metall; die braunen Linien ergeben sich durch die längere Wirkung stärkerer Lösungen und sind eine am Lichte gebräunte Verbindung des Metalls mit der Kittsubstanz (s. hierüber Gierke in: Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 393). H. Rabl (Sitz. Ber. Akad. Wien 102. Bd. 3. Abth. 1893 p. 349; Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 42) zeigt, dass der Niederschlag bestimmt nicht aus metallischem Silber besteht, da er sich in Natriumhyposulfit löst, wohl aber ein Albuminnitrat oder ein Oxyd des Silbers sein mag.

Gold.

366. Allgemeines über die Imprägnation mit Gold. Das Goldchlorid giebt im Gegensatz zum Höllenstein nur positive Imprägnationen (§ 353); negative giebt es lediglich, so weit ich weiss, wenn man es an Stelle des in den Geweben schon negativ niedergeschlagenen Silbers treten lässt. Zu diesem Zwecke imprägnirt man die Objekte erst sehr leicht mit Höllenstein, reduzirt diesen, lässt dann einige Minuten lang eine $^1/_2$ %ige Lösung von Goldchlorid einwirken und reduzirt nochmals in angesäuertem Wasser.

Diese Methode ist indessen bisher nur wenig gebräuchlich gewesen, und wenn man von der Färbung des Zellplasmas (bei Studien über die Zelle), der Cornea und des Bindegewebes absieht, so dient das Goldchlorid fast ausschliesslich zur Imprägnirung des Nervengewebes. Dafür aber zeigt es eine bemerkenswerthe Elektivität und wird daher mit Recht als ein äusserst werthvolles Mittel zum Studium der Nervenendorgane und des Verlaufes der Nerven geschätzt. Für diese Objekte kann es Präparate liefern, die an Schönheit und Klarheit von anderen Mitteln höchstens erreicht, nicht aber übertroffen werden. Aber nicht jede Vergoldung gelingt; ja, man darf nicht übersehen, dass nur sehr wenige gelingen (eine der gewiegtesten Autoritäten auf diesem Gebiete sagte mir noch jüngst, dass für die Endorgane auf 1000 Präparate nur ein gutes komme). Ferner ist es über und über bekannt, dass auch die allerbesten Vergoldungen nur so weit Glauben verdienen, wie sie etwas zeigen, dagegen gar keinen Beweis dafür liefern, dass Dinge, die sie nicht zeigen, auch nicht existiren; denn man weiss nie

sicher, ob die Imbibition des Goldsalzes nicht in launischer Weise fehlgeschlagen ist, oder die Reduktion an irgend einem Punkte launisch Halt gemacht hat. Dass die Vergoldungen aber launisch die Wirklichkeit nicht genau wiedergeben, dafür liegen Beweise genug vor.[1])

Auch die Haltbarkeit der Vergoldungen scheint im Allgemeinen nicht so gross zu sein, wie man wünschen möchte. Immerhin wird Sorgsamkeit bei dem ganzen Prozesse, speziell aber bei der Reduktion des Goldes, die Dauer der Präparate verlängern. Vielleicht gewährt auch Johnsons Vermuthung (§ 354) vom Nutzen des Sonnens der Lösungen eine gute Hülfe.

367. Mit den **käuflichen Goldsalzen** verhält es sich nach Squire (Methods p. 43), einer guten Autorität für die Kenntniss vom chemischen Verhalten unserer Reagentien, wie folgt:

Das Goldchlorid des Handels[2]) ist nicht das reine Chlorid, $AuCl_3$, sondern das krystallisirte Doppelsalz Goldchloridnatrium mit ungefähr 50 % metallischem Gold. Das Goldchloridnatrium aber des Handels ist obiges Doppelsalz mit dem gleichen Gewicht Kochsalz gemischt, enthält also etwa 25 % Gold.

Apáthy (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1897 p. 722) hat früher das Aurum chloratum flavum des Handels ($AuCl_4H + 4\,H_2O$?) benutzt, zieht aber jetzt das fuscum ($AuCl_3 + 2\,H_2O$ oder ganz wasserfrei?) vor. Beide Präparate stammen von Merck in Darmstadt.

---

[1]) Ganz vor Kurzem ist das Vergolden sowohl nach der Art der Ausführung als auch nach seinen Erfolgen in ein neues Stadium getreten: Apáthy hat seine schon lange angezeigten Methoden endlich genau veröffentlicht (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1897 p. 718—734); und falls nach ihnen auch Andere mit denselben vorzüglichen Resultaten zu arbeiten vermögen, so ist eine Umwälzung unserer Anschauungen nicht nur vom Vergolden, sondern auch von der Struktur des Nervensystems unausbleiblich. Einstweilen mögen jedoch hier auch die früheren Methoden kurz dargelegt werden; über die von Apáthy siehe § 376. [M.]

[2]) Mag für England gelten, für Deutschland aber gewiss nicht: das Goldchlorid von Merck ist zerfliesslich, und schon dieses Verhalten spricht gegen Squires Behauptung, denn das Goldchloridnatrium bildet haltbare Kristalle. Grübler & Hollborn haben mir auf meine Anfrage Folgendes mitgetheilt: das fuscum enthält etwa 53 %, das flavum nur 48 % Gold; in beiden darf ausser dem Goldchlorid nur Wasser und Salzsäure, aber kein Kochsalz vorhanden sein, und dies gilt von den Grüblerschen Präparaten. Das reine Auronatr. chlor. enthält 14,7 % Kochsalz, im Handel giebt es aber auch Sorten mit viel mehr davon. [M.]

368. Beschaffenheit der zu vergoldenden Gewebe. Man kann die Goldmethoden in 2 Gruppen bringen: die erste dient hauptsächlich zum Studium der peripheren Nerven oder Endorgane und wird entweder an ganz frischen oder wenigstens mit organischen Säuren behandelten Geweben ausgeübt; die andere ist für die Nervencentren und wird an den wie gewöhnlich gehärteten Geweben ausgeführt. (Ueber Gruppe 2 s. im Kapitel 30.)

Die klassische Regel, dass man für Untersuchungen über Nervenenden nur ganz frische Gewebe verwenden solle, scheint doch nicht immer gültig zu sein. Denn nach Drasch (Sitz. Ber. Akad. Wien 82. Bd. 3. Abth. 1881 p. 171, 88. Bd. 3. Abth. 1884 p. 534; Abh. Math. Phys. Kl. Sächs. Ges. Wiss. 14. Bd. 1887; Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 492) liefern Gewebe, die nach dem Tode 12—48 Stunden an einem kühlen Orte gelegen haben, bessere Resultate; er glaubt denn auch, die organischen Säuren in der Methode von Löwit u. A. haben vielleicht nur die Gewebe etwa in denselben Zustand zu versetzen, worin man sie eine gewisse Zeit nach dem Tode von selbst finde, d. h. wo die Nerven besonders für die Imprägnation mit Gold empfänglich seien.

369. Methode von Cohnheim (Arch. Path. Anat. 38. Bd. 1867 p. 348; Strickers Handb. Geweb. p. 1100). Nach dieser typischsten aller Goldmethoden legt man frische Stücke der Cornea (oder anderer Gewebe) in eine $^1/_2$ $^0/_0$ige Lösung von Goldchlorid, bis sie ordentlich gelb geworden sind, und setzt sie dann in Wasser mit etwas Essigsäure so lange dem Lichte aus, bis das Gold gut reduzirt ist, was spätestens in einigen Tagen geschieht. Dann legt man sie in angesäuertes Glycerin ein.

Diese Methode giebt trotz ihrer primitiven Form oft sehr gute Resultate, färbt manchmal aber die Kerne oder das Plasma, zuweilen auch die Intercellularsubstanz ähnlich wie Silber. Auch ist die Vergoldung alles andere eher als dauerhaft.

370. Methode von Löwit (Sitz. Ber. Akad. Wien 71. Bd. 3. Abth. 1875 p. 1). Im Prinzipe beruht sie darauf, dass man die Gewebe, um das Gold leichter eindringen und sich reduziren zu lassen, durch Ameisensäure zum Quellen bringt, bevor man sie vergoldet, und nachher dieselbe Säure für die Reduktion zu Hülfe nimmt. Diese Methode, die als Typus für die modernen Untersuchungen über die Nervenenden dienen mag, wird von Fischer in seiner Arbeit über die

Meissnerschen Körperchen (Arch. Mikr. Anat. 12. Bd. 1875 p. 366) wie folgt ausgeübt. Kleine Stücke frischer Haut legt man so lang in verdünnte Ameisensäure (gleiche Theile einer Säure von 1.12 sp. Gew. und Wasser), bis sich die Epidermis ablöst, dann auf 15 Minuten in das Goldchlorid (1—1½ %ige wässerige Lösung), dann 24 Stunden lang wieder in Ameisensäure (1 Theil auf 1—3 Theile Wasser), endlich ebenso lange in konzentrirte Ameisensäure; und zwar während der beiden letzten Stadien im Dunkeln. Dann macht man dünne Schnitte und schliesst diese in Dammar oder Glycerin ein. In guten Präparaten sind nur die Nerven gefärbt, aber man hat das Gelingen nicht immer in der Hand.

371. Ranviers Methode mit Ameisensäure (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 20 1880 p. 456). Die Methode von Löwit hat man später, indem man die unverdünnte Ameisensäure zum Schluss wegliess, und auch in anderen Punkten abgeändert. Ranvier nun giebt, da nach seiner Meinung die Ameisensäure zu Anfang den Endzweigen der Nerven schadet, ihr als Antagonisten ein Fixirmittel an die Seite, und zwar das Goldsalz selbst. Er bringt daher die Gewebe in ein Gemisch von 4 Theilen des 1 %igen Goldchlorids und 1 Theile Ameisensäure, das aufgekocht und wieder kalt geworden ist (Ranvier, Traité 1. Ed. p. 826). Darin bleiben sie bis zur völligen Durchtränkung (Muskeln 20 Minuten, Epidermis 2—4 Stunden), und dann lässt man sich das Gold entweder am Licht in angesäuertem Wasser, oder im Dunkeln in verdünnter Ameisensäure (1 Theil auf 4 Theile Wasser) reduziren.

Gekocht soll das Gemisch von Goldchlorid und der Säure werden, weil dadurch das Gold mehr zur Reduktion neige und daher seine elektive Wirkung auf die Nerven verstärkt werde.

372. Ranviers Methode mit Citronensaft (Traité 1. Ed. p. 813). Nach Ranvier ist von allen Säuren der Citronensaft der unschädlichste für die Nervenenden. R. legt daher die Gewebe in frischen Saft, der durch Flanell filtrirt worden ist, bis sie durchsichtig werden (Muskeln in 5—10 Minuten), wäscht sie dann rasch in Wasser, bringt sie auf 20 Minuten in das Goldchlorid (1 %), wäscht sie wieder und giebt sie in ein Glas mit 50 ccm destill. Wasser und 2 Tropfen Essigsäure. Hierin setzt er sie dem Licht aus; die Reduktion vollzieht sich in 24—48 Stunden. Die Präparate eignen sich aber nur zum sofortigen Studium, später dunkeln sie in Folge weiterer Reduktion stark nach. Will man sie hingegen dauerhaft haben, so muss man die Reduktion

im Dunkeln in nur einigen Kubikcentimetern verdünnter Ameisensäure (1 Theil Säure auf 4 Theile Wasser) geschehen lassen, und das dauert 24 Stunden.

373. Methode von Viallanes (Ann. Sc. N. (6) Tome 14 1883 p. 42). Die Gewebe werden mit einer 1 %igen Osmiumsäure behandelt, bis sie eben braun werden, dann mit 25 %iger Ameisensäure 10 Minuten lang; darauf kommen sie in Goldchlorid 1:5000 (oder noch viel schwächer) 24 Stunden lang im Dunkeln und werden zuletzt im Licht in 25 %iger Ameisensäure reduzirt. Nach meinen Erfahrungen ist die Methode ausgezeichnet; sowohl die Osmiumsäure als auch die sehr schwache Goldlösung sind wahrscheinlich auch in manchen anderen Fällen vortheilhaft.

374. Andere ältere Methoden. Die vielen anderen Methoden weichen von den aufgeführten hauptsächlich in der Art ab, wie man die Reduktion zu erleichtern und so vollständig wie möglich zu machen bestrebt war. So modifizirt Bastian die Methode von Cohnheim, indem er das Goldchlorid in einer Lösung von 1:2000 nimmt (dazu auf je 75 ccm 1 Tropfen Salzsäure) und die Reduktion sich in halb konzentrirter Ameisensäure warm vollziehen lässt. Hénocque (Arch. Phys. Paris 3. Année 1870 p. 397) imprägnirt mit $^1/_2$ %igem Goldchlorid, wäscht 12—24 Stunden in Wasser und reduzirt warm (bei 40—50°) in einer gut verschlossenen Flasche mit fast gesättigter Lösung von Weinsteinsäure. Die Reduktion ist oft schon in $^1/_4$ Stunde beendet. Diese Methode ist übrigens als die von Chrschtschonowitsch beschrieben worden (Arch. Mikr. Anat. 7. Bd. 1872 p. 383).

Hoyer (ibid. 9. Bd. 1873 p. 222) verwendet für die Nerven der Cornea eine $^1/_2$ %ige Lösung von Goldchloridkalium; dieses sei besser als das einfache Goldchlorid, da es leichter konstant zu bekommen, eher neutral und in der $^1/_2$ %igen Lösung haltbarer sei. Die Cornea nun wird mit der Lösung ganz sorgfältig durchtränkt, die vom Kaninchen oder Meerschweinchen $^1/_2$—1 Stunde, die vom Menschen (in angesäuerter Lösung) 2—5 Stunden lang, aber lieber zu lange als zu kurz. Um die intraepithelialen Nervenzweige zu zeigen, wird das Gold nur theilweise (bis die Präparate schwach graublau werden) reduzirt, indem man die Cornea auf 16—24 Stunden in 30—60 ccm destill. Wasser mit 1—2 Tropfen eines Pyrogallol-Entwicklers (s. Gerlach, Die Photographie als Hülfsmittel der mikr. Forschung, Leipzig 1863) legt. Oder man

belässt sie im Brütofen in einer konzentrirten Lösung von Weinsteinsäure bis zur völligen Reduktion.

Ciaccio (Arch. Ital. Biol. Tome 3 1883 p. 75; Journ. Micr. Paris Tome 7 1883 p. 38) verwendet Goldchloridcadmium in 1 %iger Lösung. Flechsig (1876; auch in: Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. f. 1884 p. 453) reduzirt in einer 10 %igen Natronlauge. Nesteroffsky behandelt die Präparate nach der Imprägnation mit einem Tropfen Schwefelammonium und beendet die Reduktion in Glycerin (s. Gierke in: Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 404). Carrière (Arch. Mikr. Anat. 21. Bd. 1882 p. 146) reduzirt nach Böhm in Pritchards Gemisch (1 Amylalkohol, 1 Ameisensäure, 98 Wasser).

Marchi (Arch. Ophth. 28. Jahrg. Abth. 1 1882 p. 205) legt nach Manfredis Methode die frischen Muskeln auf $^1/_2$ Stunde in 1 %iges Goldchlorid, dann in $^1/_2$ %ige Oxalsäure, die auf 36 ° C. erwärmt worden ist, lässt sie darin abkühlen, untersucht sie und hebt sie in Glycerin auf. Sonniges warmes Wetter ist dabei nöthig. Golgi (Mem. Accad. Torino (2) Tomo 32 1880 p. 382) bringt die in 2 %iger Lösung von Kaliumbichromat gehärteten Gewebe zunächst auf 10—20 Minuten in eine 1 %ige Lösung von Arsensäure, bis sie durchsichtig werden, darauf 20—30 Minuten lang in $^1/_2$ %iges Goldchloridkalium, wäscht sie mit Wasser und reduzirt sie an der Sonne 24—30 Stunden lang in einer 1 %igen Lösung von Arsensäure, die er, so bald sie braun wird, wechselt. Einschluss ebenfalls in Glycerin.

Boccardi (Lavori Istit. Fisiol. Napoli Fasc. 1 1886 p. 27; Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 492) legt zur Reduktion die Gewebe im Dunkeln 2—4 Stunden lang in eine schwache Lösung von Oxalsäure (1:1000 bis 3:1000) oder in ein Gemisch von 5 ccm Ameisensäure, 1 ccm 1 %iger Oxalsäure und 25 ccm Wasser.

Kolossow (Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 52) imprägnirt 2 bis 3 Stunden lang mit 1 %igem Goldchlorid, das mit 1 % Salzsäure vermischt ist, und reduzirt 2—3 Tage lang im Dunkeln in Chromsäure von 1:10000 bis 1:5000.

Die Vergoldung von entkalkten Zähnen s. bei Underwood (Journ. Brit. Dental Ass. Vol. 11 1890 p. 696; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1890 p. 815). Nach Geberg (Internation. Monatschr. Anat. Phys. 10. Bd. 1893 p. 205) erleichtert die Behandlung der Gewebe mit Kalkwasser (Methode von Arnstein) 24 Stunden lang die Reduktion sehr. Bernheim (Arch. Anat. Phys. Phys. Abth. f. 1892 Suppl. p. 19;

Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 484) fügt zu 10 ccm von Löwits verdünnter Ameisensäure ein Körnchen frischen schwefligsauren Natriums ($NaHSO_3$).

Dr. L. Johnson schreibt mir, ausser der Besonnung (s. § 354) sei noch auf Folgendes zu achten. Die Gewebe müsse man gut mit destill. Wasser waschen, ferner das Goldchlorid sorgfältig mit einem neutralen essigsauren oder ameisensauren Salze, oder mit Essig- oder Ameisensäure, wenigstens 24 Stunden vor der Verwendung ansäuern, endlich nachher die Gewebe wieder so lange waschen, bis Lakmuspapier keine Säure mehr anzeige.

Manche weitere Einzelheiten sowie die Imprägnation des Centralnervensystems s. in den Kapiteln 29, 30 und 33.

375. Konserviren der vergoldeten Präparate. Zum Einschluss der Präparate dient entweder Balsam oder angesäuertes Glycerin (1 % Ameisensäure). Eigentlich sollten sie, wenn die Reduktion vollendet war, sich immer gut halten, in Wirklichkeit thun sie es jedoch selten. Allermeist werden sie nachträglich schwarz. Dies lässt sich nach Ranvier dadurch vermeiden, dass man sie einige Tage lang in Alkohol legt, indessen offenbar ist auch hierdurch ihre Dauer nur etwas länger, nicht für immer garantirt. Die zu schwarz gewordenen kann man mit Cyankalium ($^1/_2$ % nach Cybulski) oder rothem Blutlaugensalz (schwache Lösung nach Redding) bleichen, ohne dass aber das Resultat besonders befriedigte. Eine Doppelfärbung lässt sich in der gewöhnlichen Weise ausführen (sehr gut mit Safranin oder Methylgrün), indessen die Kerne nehmen die Farbe nur bei negativer Imprägnation an.

376. Methoden von Apáthy (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1897 p. 718). Nach Apáthy giebt die Vorvergoldung, d. h. die Vergoldung frischer Gewebe, die entgegengesetzten Resultate von der Nachvergoldung, d. h. der Vergoldung nach dem Fixiren. Bei jener nämlich bleiben in den Zellen die Kerne fast farblos, während das Plasma sich ziemlich stark färbt; in den Muskeln sind die Primitivfibrillen sehr blass bis farblos, und die Nerven werden (mit Ausnahme der Myelinscheiden) dunkel roth-violett, sodass der Achsencylinder nur als Ganzes deutlich hervortritt. Dagegen liefert die Nachvergoldung eine scharfe Kernfärbung, während das Plasma blasser wird; in den Muskeln sind die Primitivfibrillen lebhaft kirschroth, die Neurofibrillen dagegen intensiv schwarz und von der Interfibrillärsubstanz scharf unterschieden.

Beide Arten der Vergoldung dürfen keine Imprägnation, sondern müssen eine reine Tinktion (von Hellrosa bis Dunkelviolett, je nach dem Gewebe) bewirken; nur in den Myelinscheiden lagert sich unter Umständen das Gold in Körnchen ab. Die Tinktion scheint darauf zu beruhen, dass sich aus dem Goldchlorid zunächst Goldoxyd (Au O) bildet und sich entweder als solches oder als Metall mit den Geweben verbindet. Damit das geschehen könne, muss das Licht das Gewebe von beiden Seiten her vollkommen und möglichst ungeschwächt durchdringen. Dabei ist es zwar einerlei, von welchen Thieren die Objekte stammen, aber sie dürfen nur so dünn sein, dass das Licht wirklich gut hindurch strahlen kann, müssen mithin entweder Membranen u. dgl. oder Schnitte sein. Von der Lösung des Goldsalzes (§ 367) muss man etwa 10 mal so viel nehmen, wie das Volumen des Objektes beträgt, und sie ist noch so lange gut, wie sie ihre Farbe beibehält; da sie die Gewebe etwas kontrahirt (frische sogar stark), so müssen die Objekte vorher festgesteckt, ausgespannt oder sonst wie befestigt sein, jedoch stets so, dass das Licht ungehindert hindurch kann. Nach dem Goldbade werden sie in verdünnte Ameisensäure (1 Theil der Säure von 1,223 spez. Gew. auf 100 Theilen destill. Wasser) gebracht und dürfen darin nur möglichst wenig bewegt werden, damit der purpurne Farbstoff (Goldoxyd?), der sich aus dem Goldchlorid durch das Licht bildet, nicht aus den Geweben herausgeschwemmt werde; auch müssen sie im sauren Wasser so aufgestellt werden, dass das Licht von allen Seiten hinzu kann. Die Belichtung sei so kräftig wie möglich, jedoch dürfen die Objekte dadurch höchstens 20° C. warm werden (im Winter bei 10—15° C. direkte Sonne, im Sommer diffuses Tageslicht); sie daure im Winter mindestens 8, im Sommer mindestens 6 Stunden, stets aber ununterbrochen, und nur gelegentlich im Winter mehr als 24 Stunden.

Beiderlei Vergoldungen sind absolut dauerhaft; nur freies Chlor, Brom oder Jod bleichen sie, sonst aber darf man die Präparate maceriren, färben und einschliessen, wie man will.

377. Spezielles über die Vorvergoldung (l. c. p. 728). Das frische Objekt kommt im Dunkeln in eine 1 %ige Lösung von Aur. chlor. flavum (§ 367) auf mindestens 2 Stunden, sehr dünne Membranen länger, bis über Nacht, dann direkt auf 24 Stunden in 1 %ige Ameisensäure und wird nun in ihr 6—8 Stunden lang ununterbrochen allseitig belichtet. Nach der 1. Stunde kann man die etwa dunkel gewordene

Säure wechseln, bewege aber dabei das Objekt möglichst wenig. Nachher direkter Einschluss in konz. Glycerin oder in Gummisyrup (§ 418).

Auch schon einige Zeit todte oder in Ranviers Drittelalkohol macerirte Objekte (z. B. die elektrischen Platten von *Torpedo)* liefern noch gute Präparate. — Eine etwas andere Methode der Vorvergoldung hat Apáthy (Mikrotechnik p. 173) früher angegeben. — Spezielles über die **Nachvergoldung zur Darstellung der Nervenfibrillen** s. § 704.

Andere Metalle.

378. Osmiumsäure und Pyrogallussäure. Diese Methode habe ich zuerst 1887 (La Cellule Tome 4 p. 110) und später noch zweimal publizirt. Im Wesentlichen besteht sie darin, dass die Gewebe aus der Osmiumsäure in eine schwache Lösung von Pyrogallussäure gelegt werden und sich darin bald sehr gut grünlich schwarz, bald aber auch ganz unbrauchbar schwarz färben. Unvergleichlich bessere Resultate ergiebt aber die Pyrogallussäure in ihrer Anwendung auf die Methode von Hermann. Dieser (Arch. Mikr. Anat. 37. Bd. 1891 p. 570) nämlich fixirt die Gewebe 1 oder 2 Tage lang in seiner Platin-Essig-Osmiumsäure (§ 68), wäscht sie gründlich mit Wasser und härtet sie in immer stärkerem Alkohol; endlich legt er sie zur Schwärzung 12—18 Stunden lang in rohen Holzessig, der aber so roh wie nur möglich, also recht braun sein und schlecht riechen muss (Anat. Hefte 2. Abth. 2. Bd. 1893 p. 28). Ich nun fixire die Gewebe im Gemisch von Hermann oder von Flemming; zum besseren Fixiren mögen sie darin 12 oder 24 Stunden lang bleiben; handelt es sich aber bloss um die Färbung, so lässt man sie nur $^1/_2$ Stunde darin und bringt sie dann direkt in den Holzessig, besser aber noch in eine schwache Lösung von Pyrogallussäure; für kleine Objekte ist 1 Stunde mehr als genug, grössere bleiben bis zu 24 Stunden darin. (Man kann auch eine alkoholische Lösung nehmen, und zuweilen mag diese sogar noch besser sein als die wässerige.) Tannin hat sich an Material aus Flemmings Gemisch nicht bewährt.

Man erreicht auf diese wichtige Art sowohl eine gute Kern- als auch eine brauchbare Plasmafärbung; für das Chromatin hat man zwar keinen besonderen Farbstoff mehr nöthig, kann aber Safranin doch noch anwenden (24 Stunden färben, dann saurer und neutraler Alkohol). Auch die Nebenkerne treten sehr gut hervor. An Invertebraten wird

das Nervengewebe mitunter sehr schön differenzirt. Auch ist die Methode sehr bequem und mit Pyrogallussäure sehr sicher (mit Holzessig nicht immer).

Uebrigens handelt es sich bei der Methode von Hermann keineswegs um eine Reduktion des Osmiums, sondern um eine Färbung durch Stoffe im rohen Holzessig. Denn H. hat dieselben Resultate an Material aus Sublimat oder Alkohol bekommen (Anat. Hefte 2. Abth. 1. Bd. 1892 p. 7).

Die Methode mit dem Holzessig wird auch wohl Mährenthal zugeschrieben. Azoulays Modifikation derselben für markhaltige Nerven s. unten § 716, die von Heller & Gumpertz in: Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1896 p. 385. Kolossow (ibid. 9. Bd. 1892 p. 38 und 1893 p. 316) bringt einige Mittheilungen, die mir aber ohne besonderen Nutzen zu sein scheinen.

379. Osmiumsäure und Oxalsäure nach Brösike (Centralbl. Med. Wiss. 16. Jahrg. 1878 p. 833; Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 409). Man legt die Objekte aus der Osmiumsäure auf wenigstens 24 Stunden in eine wässerige Lösung von Oxalsäure (1:15) und erhält so eine rothe Färbung.

380. Eisenchlorid. Es giebt nach Polaillon (Journ. Anat. Phys. Paris 3. Année 1866 p. 43) zuweilen gute Resultate; so färben sich in den peripheren Ganglien nur die nervösen Elemente, nicht auch das Bindegewebe. Imprägnirt wird mit Eisenchlorid, reduzirt in Tannin, Gallus- oder Pyrogallussäure. Die Hoggans (Journ. Quekett Micr. Club 1876; Journ. R. Micr. Soc. London Vol. 2 1879 p. 358) fixiren das Objekt mit Höllenstein, lassen sich das Silber etwas reduziren, entwässern das Präparat dann mit Alkohol, bringen es in eine 2%ige alkoholische Lösung von Eisenchlorid, nach einigen Minuten in eine gleiche von Pyrogallussäure, endlich nach genügender Schwärzung in Wasser und von da in Glycerin. Fol fixirt die Objekte mit Eisenchlorid und lässt sie dann 24 Stunden in Alkohol mit einer Spur Gallussäure (Genaueres s. § 70). Ueber Eisenchlorid und andere Eisensalze zur Hervorrufung von Berlinerblau in Schnitten siehe die Methode von List (§ 638). S. auch oben p. 202 Anm.

381. Chlorpalladium nach F. E. Schultze (s. oben § 69 und § 103). **Berlinerblau** nach Leber (Arch. Ophthalm. 14. Bd. 1868 p. 300) und Ranvier (Traité 1. Ed. p. 108), nach List s. unten § 638. **Ferrocyankupfer** oder **Bleichromat** nach Leber (ibid.). **Schwefelmetalle** nach Landois (Centralbl. Med. Wiss. 3. Jahrg. 1865 p. 867; Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 497). **Ammoniummolybdänat** nach Merkel und Krause (ibid. p. 96). **Rutheniumoxychlorid** nach Nicolle & Cantacuzène (Ann. Inst. Pasteur Tome 7 1893 p. 331).

Ueber die Imprägnation mit **Fetten** nach Altmann s. § 550.

---

19. Kapitel.

Flüssige und feste Medien zum Untersuchen und Einschliessen der Objekte.

382. Einleitende Bemerkungen. In diesem Kapitel sollen alle Medien besprochen werden, worin ein Objekt mit dem Mikroskop untersucht werden kann. Die alte Unterscheidung zwischen sogenannten indifferenten Medien und solchen, die auf die Gewebe irgend eine Wirkung ausüben, scheint mir mehr irre zu führen als zu helfen, denn kein einziges Medium ist ja absolut wirkungslos mit Ausnahme des Saftes, der das Gewebe im Leben umgiebt, und selbst dieser ist es nur, so lange es in situ bleibt; nimmt man hingegen ein Stück Gewebe aus dem Organismus heraus und bringt es auf den Objektträger, so schafft man schon damit künstliche Bedingungen.

Eine besondere Gruppe brauchen die Einschlussmedia nicht zu bilden, denn man kann in allen präservirenden Medien einschliessen; allerdings sind die einzigen, die eine absolut sichere Erhaltung weicher Gewebe verbürgen, harziger Natur (s. § 436 ff.). Wie man mit flüssigen Medien Dauerpräparate herstellen kann, ist im Anfang des Kapitels 20 auseinandergesetzt.

Wässerige oder alkoholische Medien.

383. Wasser. Um es vor dem Verderben zu bewahren, lasse man in dem Vorrathsgefäss ein Stück Thymol oder Kampfer schwimmen. Das Wasser kann ohne Schaden, mitunter sogar wegen seines geringen Refraktionsindex mit grossem Nutzen, zur Untersuchung von Geweben, die mit Osmiumsäure, Chromsäure oder Salzen der Schwermetalle konservirt worden sind, gebraucht werden, taugt dagegen absolut nicht für frische Gewebe. Es ist — und hierauf achte der Anfänger besonders — durchaus nicht indifferent: manche Elemente der Gewebe, z. B. die Endorgane der Nerven, verändern sich darin erheblich, andere, z. B. die rothen Blutkörperchen, gehen bei längerem Verweilen darin ganz zu Grunde.

384. Theoretisches über die indifferenten Medien. Will man Wasser für frische Gewebe unschädlich machen, so muss man ihm zunächst die Dichtigkeit des Gewebesaftes verleihen, um die so sehr schädliche Osmose auszuschliessen. Dies kann man z. B. durch Zusatz von Kochsalz erreichen. Da aber in den Zellen auch kolloide Substanzen vorhanden sind, so muss man dem Medium ausser dem Salze die richtige Menge eines Kolloids zusetzen, z. B. indem man es mit Eiweiss vermischt. So enthalten denn auch alle sogenannten indifferenten Medien Kristalloide und Kolloide; z. B. nach Frey der Humor aqueus aus der vorderen Augenkammer auf 987 Theile Wasser etwa 4,6 Kolloide und 7,8 Kochsalz; in 1000 Theilen Liquor amnii sind etwa 3,8 Theile Eiweiss, 5,8 Salz und 3,4 Harnstoff, im Blutserum 8,5 % Kolloide und 1 % Kristalloid.

385. Normalsalzwasser (sogenannte physiologische Salzlösung): 0,75 % Chlornatrium in destillirtem Wasser gelöst. Carnoy empfiehlt den Zusatz einer Spur von Osmiumsäure.

Nach Locke (Boston Med. Surg. Journ. 1896 N. 13; Centralbl. Phys. 10. Bd. 1896 p. 514) muss man, um eine indifferente Flüssigkeit zu erhalten, zur isotonischen Lösung von Chlornatrium — diese ist nach Hamburger 0,9 bis 1 % — 0,01 % Chlorkalium und 0,02 % Chlorcalcium setzen. Für die Erythrocyten empfiehlt Malassez (C. R. Soc. Biol. Paris (10) Tome 3 1896 p. 504 und 511) etwa 1 % Chlornatrium.

386. Chlormangan nach Pictet (Mitth. Z. Stat. Neapel 10. Bd. 1891 p. 89): eine 5—10 %ige Lösung von Chlormangan in destillirtem Wasser mit einem geringen Zusatz einer Lösung von Dahlia. Nach meiner Erfahrung ist es ausgezeichnet. Indessen hat die Lösung nur für Seethiere die richtige Konzentration, für Landthiere sollte sie schwächer sein (1—3 %).

387. Jodserum, von Max Schultze (Arch. Path. Anat. 30. Bd. 1864 p. 263) eingeführt. Ranvier (Traité 1. Ed. p. 76) empfiehlt nur das Amnioswasser von Säugethieren. Man nehme einen absolut frischen Uterus vom Schafe oder der Kuh (in grossen Schlachthäusern leicht zu haben), steche ihn an, fange das herausspritzende Serum in einer Flasche mit sehr weitem Boden auf, werfe Stückchen Jod hinein und lasse es einige Tage unter häufigem Umschütteln damit in Berührung. Das Serum darf in der Flasche nicht hoch reichen, sonst gelangt das Jod nicht leicht überall hin. Oder man mischt Serum mit viel Jodtinktur, lässt absetzen, filtrirt und erhält so ein sehr stark jodirtes

Serum; von diesem giebt man alle 2—3 Tage ein wenig zu dem Serum, das man benutzen will. Uebrigens nimmt auch das Serum. wenn man es mehrere Wochen über Jod stehen lässt, immer mehr davon auf, wird dunkelbraun und dient dann noch besser als das vorige zum Jodiren des frischen Serums in verschiedenen Stärken. Im Allgemeinen darf es zum Maceriren nur hellbraun sein.

388. Humor aqueus. Hühnereiweiss. Beide brauchen nur filtrirt zu werden. Jodirung nach Belieben. S. auch § 879 das Gemisch für Sporozoen.

389. Künstliches Jodserum nach Frey (Mikroskop 6. Aufl. Leipzig 1877 p. 75): destillirtes Wasser 270 ccm, Eiweiss 30 ccm, Chlornatrium $2^1/_2$ g; man filtrirt und setzt Jodtinktur hinzu.

390. Künstliches Serum nach Kronecker (aus Vogt & Yung, Lehrb. Vergl. Anat. 1888 1. Bd. p. 478): Seesalz 6 g, Aetznatron 0,06 g, Wasser 1 Liter. Böhm & Oppel (Taschenbuch 3. Aufl. 1896 p. 19) nehmen statt des Aetznatrons die gleiche Menge Natriumkarbonat.

391. Blutserum. Moore (Journ. Morph. Boston Vol. 13 1897 p. 342) verwendet für *Bdellodrilus*, speziell seine Nephridien, ein Gemisch gleicher Theile von destillirtem Wasser und Blut von *Astacus fluviatilis*.

Migula (Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1890 p. 172) giebt eine sehr umständliche und wohl überflüssige Art an, ein Gemisch von Blutserum und Glycerin zu bereiten.

392. Zuckersaft. Zucker wird im gleichen Gewicht Wasser heiss gelöst. Ist (auch in grösserer Verdünnung) für manche Gewebe ein ausgezeichnetes Medium. Gegen den Schimmel setze man 1—7 % Chloralhydrat oder 1 % Karbolsäure hinzu. Auch zum Einschluss kann er dienen, aber der Zucker kristallisirt gern aus.

393. Chlorcalcium nach Harting (Mikroskop 2. Aufl. 1886 2. Bd. p. 297): die wässerige Lösung entweder gesättigt oder mit 4—8 Theilen Wasser verdünnt. Bricht das Licht ziemlich schwach und trocknet nicht ein.

394. Kaliumacetat nach Max Schultze (Arch. Mikr. Anat. 7. Bd. 1872 p. 180). Eine nahezu gesättigte Lösung in Wasser. Trocknet nicht ein, bricht das Licht nicht so stark wie Glycerin und soll auch die Schwärzung der mit Osmiumsäure konservirten Objekte verhindern, was mir aber äusserst fraglich ist.

395. Chloralhydrat. Wässerige Lösung, entweder 5 % (Lawdowsky in: Arch. Mikr. Anat. 13. Bd. 1876 p. 359) oder $2^1/_2$ % (Brady, British Copepods) oder 1 % (Munson in: Journ. R. Micr. Soc. London f. 1881 p. 847).

396. Alkohol. Zum Einschluss nicht besonders geeignet, da er schwach nicht gut konservirt, stark aber den Kitt um das Deckglas angreift. Er dient übrigens ja hauptsächlich nur zur vorläufigen Aufhebung von Objekten, die noch weiter verarbeitet werden sollen. S. hierüber oben p. 5.

397. Methylalkohol. Wegen seiner schwachen Lichtbrechung ist er unter Umständen als Medium zum Beobachten wichtig. So hat ihn Rabl (Anat. Anzeiger 4. Jahrg. 1889 p. 30) bei seinen Untersuchungen über die Zelltheilung benutzt; die Präparate hielten sich aber nur einige Tage.

398. Formaldehyd. S. oben § 90 und 109.

399. Gemisch von Gilson (Carnoy, Biologie cellulaire p. 94): 60 %iger Alkohol 60 ccm, Wasser 30, Glycerin 30, Essigsäure (15 Theile Eisessig und 85 Theile Wasser) 2 ccm, Sublimat 0,15 g. Ist ein ausgezeichnetes Mittel zum Studium feiner Zellstrukturen an gut gehärteten Objekten, nicht aber zum Aufbewahren, da das Sublimat die Gewebe körnig macht (gilt auch von den folgenden Gemischen, § 400—403).

400. Eiweiss nach Gage (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 223): Eiweiss 15 ccm, Wasser 200 ccm, Kochsalz 4 g, Sublimat 0,5 g. Zu filtriren und kühl aufzubewahren. Empfohlen zum Studium von rothen Blutkörperchen und Flimmerzellen.

401. Gemische von Pacini. Im Wesentlichen Sublimat ($^1/_2$—$^1/_3$ %) in Wasser gelöst mit Glycerin und etwas Kochsalz oder Essigsäure. (S. die früheren Auflagen dieses Buches.) Ganz antiquirt und überflüssig.

402. Gemische von Goadby. Eine Lösung von Kochsalz, Alaun und ganz wenig Sublimat in Wasser. Ganz ungeeignet für histologische Zwecke.

403. Gemisch von Owen (Vogt & Yung, Lehrb. Vergl. Anat. 1. Bd. 1888 p. 18). Aehnlich dem vorigen.

404. Kupfersalze nach Ripart & Petit (Carnoy, Biologie cellulaire p. 95): Kampherwasser (nicht gesättigt) und destillirtes Wasser je 75 ccm, Eisessig 1 g, Kupferacetat und Chlorkupfer je 0,30 g. Für zarte frische Gewebe äusserst werthvoll; kann auch mit Methylgrün zusammen angewandt werden. Eine Spur Osmiumsäure oder Sublimat erhöht die Wirkung als Fixirmittel.

405. Tannin nach Carnoy (l. c.). Eine $^1/_3$ %ige Lösung von Tannin in destillirtem Wasser. Dient als Beobachtungsmittel.

406. Pikrokarmin. Wurde von Ranvier als Medium für das Zerzupfen frischer Gewebe empfohlen, da er die Form der Zellen darin fixirt zu sehen glaubte. Carnoy hat sich aber bereits dagegen ausgesprochen. (S. auch § 232.)

407. Methylgrün. In ziemlich konzentrirter wässeriger Lösung ist es recht gut zum Beobachten frischer Gewebe, die es leidlich fixirt, noch besser allerdings durch Zusatz einer Spur von Osmiumsäure. S. im Uebrigen § 283.

408. Gemisch von Wickersheimer (Z. Anzeiger 2. Jahrg. 1879 p. 670). Ganz unbrauchbar.

409. Gemische von F. Meyer (Arch. Mikr. Anat. 13. Bd. 1876 p. 868). Holzessig mit etwas Salicylsäure darin, dazu viel Glycerin und Wasser. Soll sich gut zum Aufheben von Infusorien, Nematoden, *Hydra* etc. eignen.

410. Gemisch von Noll (Z. Anzeiger 6. Jahrg. 1883 p. 472). Gleiche Theile des einen Gemisches von Meyer (§ 409) und des von Farrants (§ 413). Soll kleine Crustaceen und ihre Larven sehr gut konserviren, ebenso gehärtete und gefärbte Hydroiden, Medusen und andere Cölenteraten.

411. Gemisch von Deane. Gelatine, Honig, Kreosot, Wasser und Alkohol. Wohl ganz überflüssig.

412. Gemisch von Hoyer (Biol. Centralbl. 2. Jahrg. 1882 p. 23). Ein hohes Glas mit weitem Halse wird zu zwei Dritteln mit Stücken von Gummi arabicum gefüllt und dann bis an den Hals voll gegossen entweder mit einer Lösung von Kaliumacetat (oder Ammoniumacetat) oder mit einer mehrprozentigen Lösung von Chloralhydrat, die 5—10% Glycerin enthält. Unter häufigem Umschütteln löst sich das Gummi in einigen Tagen zu einem Syrup, der, durch „Wollpapier" filtrirt, sich lange klar hält (sollten sich Pilze zeigen, so wird etwas Chloralhydrat zugesetzt und nochmals filtrirt). Das Gemisch mit Chloralhydrat dient für Präparate, die mit Karmin oder Hämateïnthonerde gefärbt sind, das andere für die mit Theerfarbstoffen tingirten.

413. Gemisch von Farrants (Beale, How to work etc. p. 58): auserlesene Stücke von Gummi arabicum und Wasser je 10, Glycerin 5 g. In gut verschlossener Flasche mit einem Stück Kampher aufzubewahren. (Andere Vorschriften lauten ähnlich, setzen aber etwas arsenige Säure zu.)

414. Gemisch von Langerhans (Z. Anzeiger 2. Jahrg. 1879 p. 575): Gummi arabicum und Wasser je 5 g; nach 12 Stunden fügt man hinzu Glycerin 5 g, 5%ige Lösung von Karbolsäure 10 g.

415. Gemisch von Faris (The Microscope Vol. 10 1890 p. 59; Journ. R. Micr. Soc. London 1890 p. 514): Gummi arabicum 60 g, Glycerin und Wasser je 45 g, Thymol 1 g. Heiss zu lösen und zu filtriren.

416. Gemisch von Shimer (The Microscope Vol. 9 1889 p. 138; Journ. R. Micr. Soc. London 1890 p. 411): gleiche Theile von Glyceringelatine nach Fols 2. Formel (unten § 430), Gemisch von Farrants und Glycerin.

417. Gemisch von Cole. S. § 181.

418. Gemisch von Apáthy (s. oben p. 184). Dieses Gemisch von Gummi, Zucker und Wasser wird von Apáthy ganz allgemein zum Einschliessen von Präparaten empfohlen. Es wird sehr hart und kann in Verbindung mit einer Papierzelle (unten § 451) zum Umrahmen von Glycerinpräparaten dienen.

419. Gemisch von Fabre-Domergue (La Nature 1889 No. 823): Syrup von Traubenzucker (vom spez. Gew. von 1,20) 10, Methylalkohol 2, Glycerin 1 Theil, Kampher, so viel sich löst. Der Traubenzucker wird heiss gelöst. Die Säure des Gemisches muss mit ein wenig Soda oder Pottasche abgestumpft werden. Es soll fast alle Farben unverändert konserviren.

420. Gemisch von Brun (nach Fabre-Domergue, Prem. principes du microscope Paris 1889 p. 123): destill. Wasser 14, Traubenzucker 4, Kampherspiritus und Glycerin je 1 Theil; der ausfallende Kampher wird abfiltrirt. Nach Henneguy, der mich auf dies Gemisch aufmerksam macht, ist es besser als Glycerin, da es die Theerfarbstoffe, auch Methylgrün, nicht auszieht.

421. Lävulose (Fruchtzucker). Wird von Schiefferdecker (Das Mikroskop etc. 1889 p. 224) als Einschliessmittel empfohlen. Sie kristallisirt nicht, schadet den Färbungen mit Karmin und Theerfarbstoffen nicht und bricht das Licht etwas stärker als das Glycerin. Die Objekte kann man direkt aus Wasser hineinlegen.

422. Glycerin. Mit Wasser verdünntes Glycerin dient häufig als Medium zum Untersuchen und Einschliessen; die Verdünnung ist oft rathsam, da die Verringerung der Brechbarkeit des Glycerins manche Strukturen in den Objekten besser sichtbar macht. Will man aber einen sicheren Einschluss haben, so wähle man das Glycerin so konzentrirt wie nur möglich.

Die Gewebe muss man, um wirklich gute und dauerhafte Präparate zu bekommen, lange mit immer stärkerem Glycerin durchtränken. Thut man dies auf dem Objektträger, so nimmt man alle 1—2 Tage das Deckglas ab und giebt frisches Glycerin hinzu; in der Zwischenzeit aber kittet man (nach Beale) das Deckglas luftdicht auf, da das Glycerin sonst aus der Luft viel Wasser anzieht; das Deckglas kann man bequemer abnehmen, wenn man den Objektträger einige Male durch eine Spiritusflamme zieht. Jedenfalls muss schliesslich das ganze Präparat gründlich mit starkem, reinem Glycerin durchtränkt worden sein.

Zum Verschlusse solcher Präparate bestreicht man, nachdem man das überflüssige Glycerin so gut wie möglich abgewischt hat, die Ränder des Deckglases mit Glyceringelatine, und sobald diese erstarrt ist, mit irgend einem der gebräuchlichen Kitte (s. im folgenden Kapitel).

Glycerin löst Calciumkarbonat auf, ist daher bei Präparaten mit Kalknadeln etc. zu vermeiden. — Ueber das Medium von Henking (verdünntes Glycerin mit Osmiumsäure etc.) s. unten § 612.

423. Besonders stark lichtbrechendes Glycerin. Der Refraktionsindex von Glycerin (1,47) kann durch Zusatz von Chlorcadmium auf 1,504, von Chloralhydrat (bis zur Sättigung) auf 1,51, von Zinkjodat auf 1,56 erhöht werden. Hierdurch lassen sich die homogenen Linsen besser ausnützen.

424. Glycerin und Alkohol. Gemische dieser beiden sind von grossem Nutzen, da sie die Ueberführung zarter Objekte von schwachem in starkes Glycerin möglich machen. Man legt das Objekt nämlich einfach in einen Tropfen davon ein und lässt diesen an der Luft sich durch die Verdunstung des Alkohols allmählich konzentriren, worauf man entweder das Präparat direkt umrahmt oder das Objekt in reines Glycerin oder Glyceringelatine legt.

a) nach Calberla (Zeit. Wiss. Z. 30. Bd. 1878 p. 442): Glycerin 1. Alkohol (Stärke nicht angegeben) 2, Wasser 3 Theile. Aeusserst brauchbar. auch (oben p. 5) manchmal besser als reiner Alkohol zum Aufbewahren fixirter Thiere, die noch weiter verarbeitet werden sollen.

b) nach Lee: Glycerin und Alkohol von 96 % je 1, Wasser 2 Theile. Für sehr zarte Objekte empfehlenswerth.

c) nach Hantsch: Glycerin 1, absol. Alkohol 3, Wasser 2 Theile.

d) nach Jäger (Vogt & Yung, Lehrb. Vergl. Anat. 1. Bd. 1888 p. 16): Glycerin und Alkohol je 1, Seewasser 10 Theile.

425. Glyceringelatine nach Deane (Frey, Mikroskop 6. Aufl. Leipzig 1877 p. 134). 1 g Gelatine löst man in 2 g Wasser und setzt 4 g Glycerin hinzu. Dieses Gemisch und die folgenden (§ 426—432) müssen natürlich warm gebraucht werden.

426. Glyceringelatine nach Lawrence. Aehnlich, aber die Gelatinelösung wird durch Kochen mit Eiweiss geklärt, dann filtrirt und mit etwas Kampherwasser vermischt.

427. Glyceringelatine nach Beale (How to work etc. p. 57). Man lässt Hausenblase oder Gelatine quellen, bringt sie dann zum Schmelzen (klärt sie, falls erwünscht, nach § 426) und giebt das gleiche Volumen Glycerin hinzu.

428. Glyceringelatine nach O. Brandt (Zeit. Mikr. Berlin 2. Bd. 1880 p. 69). Geschmolzene Gelatine 2, Glycerin 3 Theile. Man filtrirt weder durch Papier, weil dies zu langsam geht, noch durch Flanell, weil zu viel Fäden hineingerathen, sondern durch Glaswolle, während der Trichter auf eine einfache Art (s. im Original) warm gehalten wird. Einige Tropfen Karbolsäure werden dem Filtrat zugesetzt. Die Objekte werden, bevor man sie auf den Objektträger bringt, in einem Fläschlein voll warmer Glyceringelatine mit dieser durchtränkt.

429. Glyceringelatine nach Kaiser (Bot. Centralbl. 1. Jahrg. 1880 p. 25). 7 g beste französische Gelatine weicht man 2 Stunden lang in 42 g destill. Wasser ein, giebt 50 g Glycerin und 1 g Karbolsäure hinzu, erwärmt unter Umrühren 10—15 Minuten und filtrirt heiss durch befeuchtete feinste Glaswolle. — Mein schon viele Jahre alter Vorrath ist noch ganz klar.

430. Glyceringelatine nach Fol (Lehrbuch p. 138). Drei Vorschriften:

a) Man schmilzt 1 Volumen von Beales Gelatine (s. § 427) und 1/2 Volumen Wasser zusammen und setzt als Antiseptikum Salicylsäure, Karbolsäure oder Kampher hinzu.

b) Gelatine 30, Wasser 70, Glycerin 100 Theile zu mischen, nachher dazu Kampherspiritus 5 Theile.

c) Gelatine 20, Wasser 150, Glycerin 100, Kampherspiritus 15 Theile.

431. Glyceringelatine nach Squire (Methods p. 84). Man weicht 100 g Gelatine in Chloroformwasser ein, lässt dieses, wenn sie weich geworden, ablaufen und löst die Gelatine warm in 750 g Glycerin auf. Dann fügt man ein Gemisch von 400 g Chloroformwasser und etwa 50 g frischem Hühnereiweiss hinzu, kocht das Ganze 5 Minuten lang und füllt mit Chloroformwasser bis zu 1550 g auf. Man filtrirt warm.

432. Glyceringelatine nach Gilsons brieflicher Mittheilung. 1 Volumen vorher eingeweichter und dann geschmolzener Gelatine vermischt man mit 1 Volumen konzentr. Glycerin, wirft so viel Chloralhydrat hinein, bis das Volumen sich um die Hälfte vermehrt, und erwärmt bis zur völligen Lösung. Das Gemisch bricht das Licht sehr stark und kann daher für undurchsichtige Gewebe nützlich werden. — Eine ähnliche Vorschrift hat Geoffroy (Journ. Bot. 1893 p. 55; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1893 p. 476) gegeben: 3—4 g Gelatine, 100 ccm einer 10%igen Lösung von Chloralhydrat.

433. Kaliumquecksilberjodid nach Stephenson (Journ. R. Micr. Soc. London (2) Vol. 2 1882 p. 167). Jodkalium und Quecksilberjodid werden zusammen in Wasser gelöst, aber so, dass von beiden ein Theil ungelöst bleibt. Die Flüssigkeit hat dann ein spezif. Gewicht von 3,02 und den Refraktionsindex n = 1,68. Durch Verdünnen mit Wasser lassen sich alle niedrigeren Indices erhalten. Die Deckgläser sind mit Wachs zu verkitten und dann noch mit 2 oder 3 Anstrichen von Goldgrund (§ 457) und einem von Schellack zu versehen.

Ich habe mit verschiedenen Lösungen Versuche angestellt. Für permanente Präparate taugen sie nicht, weil sich Präcipitate in der Lösung bilden. Dagegen können sie zum Beobachten mitunter gute Dienste leisten, da ja die Gewebe ohne Entwässerung darin als in einem Medium liegen, das das Licht stärker bricht als irgend ein Harz.

434. Monobromnaphthalin. Vergl. Flesch (Z. Anzeiger 5. Jahrg. 1882 p. 555); Abbe und van Heurck (Journ. R. Micr. Soc. London Vol. 3 1880 p. 1043).

435. Stark lichtbrechendes Medium von Thompson (Journ. R. Micr. Soc. London f. 1892 p. 902). Besteht aus Brom, Schwefel und arseniger Säure.

Oele, Harze und Balsame.

436. Allgemeines. Harze und Balsame sind Lösungen von glasigen oder amorphen Substanzen in ätherischen Oelen. Durch Destillation oder Trocknen an der Luft verlieren sie das Oel und werden fest. Nur diese festen Harze sollten — und dieser Ansicht sind mit mir, glaube ich, die besten Mikroskopiker — in der Mikrotechnik verwandt werden; die rohen Harze enthalten nämlich stets etwas Wasser, das ihre klare Löslichkeit in den gewöhnlichen Mitteln erschwert, den optischen und auch den konservirenden Eigenschaften Eintrag thut und besonders den gefärbten Präparaten schädlich ist. Ich bin daher nicht der gegentheiligen Meinung von Fol (Lehrbuch p. 138), sondern empfehle zunächst das Harz (den Balsam) bei gelinder Wärme zu trocknen, sodass es in der Kälte spröde ist, und dann in einem geeigneten Mittel zu lösen. Solche harten Harze findet man jetzt leicht käuflich.

Die Lösungen in flüchtigen Medien, z. B. Xylol oder Chloroform, werden rasch wieder hart, aber auch brüchig. Nimmt man dagegen zur Lösung ein weniger flüchtiges Medium, z. B. Terpentinöl, so ist das erst viel später der Fall. Man brauche daher jene nur, wenn das Präparat rasch trocken werden soll, diese dagegen immer, wenn man in erster Linie ein möglichst dauerhaftes Präparat haben will.

Nach meiner Erfahrung existirt überhaupt kein fehlerfreies Harz für mikroskopische Präparate. Lösungen von Dammarharz in Xylol sind zwar, rein physikalisch betrachtet, sehr gut und zeigen feine Strukturen oft besser als Kanadabalsam, aber ich hege den Argwohn, dass keine einzige völlig stabil ist. Meine alten Präparate sind meist körnig und daher mehr oder weniger schlecht geworden. (In den schlimmsten Fällen sind diese Körner schon bei schwachen Vergrösserungen sichtbar; aber manchmal sind sie äusserst klein und können dann für normale Theile der Zellen gehalten werden). Die Präparate in Xylol- oder Benzolbalsam verhalten sich ähnlich, aber nicht so schlimm. Der Chloroformbalsam ist in dieser Beziehung viel besser, schadet aber den Theerfarbstoffen und wird mit dem Alter

sehr braun. Der Alkoholbalsam nach Seiler (§ 439) hält sich ausserordentlich gut, taugt aber ebenfalls für die Theerfarbstoffe nicht. Ich brauche ihn für Präparate, die mit Karmin oder Eisenhämatoxylin gefärbt sind. Für die mit Theerfarbstoffen tingirten nehme ich jetzt gewöhnlich Kolophonium mit Terpentinöl; dies hält sich vorzüglich und zeigt die feineren Strukturen sehr gut; nach Mayer schadet es aber, wie alle Balsame mit Terpentinöl, den Färbungen mit Hämateïnthonerde. Allerdings hat es für Objekte, die stark aufgehellt werden müssen, einen ziemlich niedrigen Brechungsindex, und für solche verwende ich daher sehr oft statt eines Harzes einfach Cedernöl. Dieses hält sich völlig gut und wird auch mit dem Alter dick genug, um das Deckglas fest zu halten; übrigens kann man ja die Präparate mit Bells Kitt umrahmen. Und hat man ein frisches Präparat mit der Oelimmersion betrachtet, so kann man stets leicht das Deckglas wechseln, indem man es durch einen Tropfen Cedernöl, den man am Rande zusetzt, zum Schwimmen bringt und dann wegschiebt.

Ein fernerer Vorzug des Kolophoniums mit Terpentinöl ist der, dass es beim Trocknen lange nicht so sehr an Volumen verliert wie die Harzlösungen mit flüchtigen Medien. Wer z. B. Benzolbalsam braucht, muss oft zwischen Deckglas und Objektträger Papierstreifen legen, um die Schnitte vor dem Zerdrücken beim Austrocknen des Balsams zu schützen. Das ist bei Terpentinöl nicht nöthig. Endlich behalten die Harzlösungen mit diesem Oel auch ihren Refraktionsindex viel länger bei als die mit flüchtigen Medien, da in diesen mit dem Alter die Präparate oft so durchsichtig werden, dass viele Einzelheiten verloren gehen. (Man kann solche Präparate einfach dadurch wieder gut machen, dass man sie, ohne das Deckglas abzunehmen, auf 1 bis 2 Tage in Benzol legt; dieses dringt in den Balsam ein und erniedrigt seinen Index wieder.) Die Sichtbarkeit feiner Strukturen ist nämlich proportional der Differenz zwischen dem Index des Objektes und dem des Mediums; da nun die meisten Gewebe einen etwas höheren Index haben als Kanadabalsam, so nimmt natürlich durch Herabsetzung des Index des Balsams die Sichtbarkeit zu, und das Desideratum ist stets nur das, ein Medium zu finden, dessen Index eine gute Sichtbarkeit verbürgt und doch nicht so niedrig ist, dass er die numerische Apertur der Objektive in ihrer Leistung ernstlich heruntersetzt.

437. Wahl des Einschlussmittels. Aus all diesen Gründen empfehle ich im Allgemeinen das Kolophonium mit Terpentinöl (s. jedoch

§ 441); braucht man einen höheren Index, so nehme man für die Präparate mit Theerfarben Cedernöl und für die mit Karmin oder Eisenhämatoxylin Seilers Alkoholbalsam.[1]) Für solche mit Hämateïnthonerde vielleicht Xylolbalsam, obwohl meine Präparate, so weit ich das kontroliren kann, sich gut in Cedernöl oder Kolophonium mit Terpentinöl gehalten haben. Jedenfalls ist Xylolbalsam ein gutes Medium, und ich möchte auch nur darauf hinweisen, dass er nicht ganz zuverlässig ist wegen der Möglichkeit des Auftretens von Tröpfchen (P. Mayer ist derselben Meinung).

438. Kanadabalsam.[2]) Man löse festen Balsam (§ 436) in Xylol, Benzol, Chloroform oder Terpentinöl bis zur gewünschten Konsistenz auf. Terpentinöl nehme man nur, wenn man ein sehr langsam erhärtendes Medium haben will, sonst aber ist für die meisten Objekte Xylol am besten, und Benzol hat nur dann einen Zweck, wenn man mit der Zeit geizt, denn Benzolbalsam wird rascher hart als Xylolbalsam.

Sahli (Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 5) empfiehlt zur Lösung Cedernöl. S. auch § 624 (Eisig).

439. Alkoholbalsam nach Seiler (Proc. Amer. Soc. Micr. Vol. 2 1881 p. 60; Journ. R. Micr. Soc. London (2) Vol. 2 1882 p. 126). Trockener Balsam wird in warmem absolutem Alkohol gelöst und durch „absorbent cotton" filtrirt. Seiler sagt, man könne die Objekte direkt aus absolutem Alkohol in diesen Balsam bringen, und so werde nicht nur jede Schrumpfung vermieden, sondern auch das Fett in den Zellen nicht aufgelöst. Ich finde, die direkte Uebertragung ist doch nicht sehr einfach, und empfehle sie daher im Allgemeinen nicht. Hat man aber in der gewöhnlichen Weise das Objekt vorher durch Xylol (oder ein anderes Vorharz) wandern lassen, so ist der Seilersche Balsam für viele Zwecke wirklich sehr gut.

Wie schon angegeben, ist die Lösung eine der haltbarsten, die ich kenne. (Mein Vorrath ist seit 15 Jahren noch ganz klar und hat

---

[1]) Ich ziehe diesem den Terpentin nach Vosseler (§ 442) vor. [M.]

[2]) Grübler & Hollborn bereiten jetzt einen ganz neutralen Kanadabalsam. in dem sich mir sehr empfindliche Präparate, die in jeder Art von Balsam sofort verblassten, seit 13 Monaten unverändert gehalten haben. Dieser Balsam verträgt das Austrocknen auf dem Wasserbade (um das Terpentinöl zu verjagen) und das Wiederauflösen in Xylol, ohne sauer zu werden, ist also zu empfehlen. Ueber die Neutralisirung des Balsams mit Natrium- oder Kaliumkarbonat s. auch Colucci (Giorn. Ass. Med. Natural. Napoli Anno 7 1897 p. 172). [M.]

nicht stark gedunkelt.) Man kann bequem damit arbeiten, darf allerdings während des Einlegens der Objekte nicht darauf athmen, weil sonst leicht Wolken darin auftreten.[1]) Sie definirt sehr gut, und die Präparate halten sich auch fast unverändert (nur meine ganz alten zeigen einige unbedeutende Körnchen). Allerdings ist sie nicht für die in Alkohol löslichen Theerfarbstoffe geeignet.

440. Dammarharz. Die Medien zum Lösen sind dieselben wie bei Kanadabalsam, und man macht die Lösungen auch genau so wie dort. Am besten ist Xylol; das Harz löst sich darin auch ohne Erwärmen.

Martinotti (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 156) giebt genaue Maassregeln (meiner Ansicht nach unnöthig) zur Bereitung der Lösung. Flemming, Pfitzner etc. nehmen ein Gemisch von Benzol und Terpentinöl (Arch. Mikr. Anat. 19. Bd. 1881 p. 322; Morph. Jahrb. 6. Bd. 1880 p. 469 etc.). Noch manche andere Vorschrift existirt in der Literatur (s. die 4. englische Ausgabe dieses Buches, p. 281).

Gerne erkenne ich die besonders scharfe Definition an, die man mit Lösungen von Dammar erhält, bin aber fest davon überzeugt, dass man sich für wirkliche Dauerpräparate auf keine davon verlassen kann: oft schon nach Tagen oder Wochen, spätestens nach Jahren, treten die in § 436 erwähnten Körnchen auf.

Gum Thus („from a Pinus indigenous to the eastern United States") ist nach Eisen (Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 201) besser und viel billiger als Kanadabalsam. Lösung in Xylol.

441. Kolophonium. Die Lösung in Terpentinöl wurde zuerst von Kleinenberg (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 19 1879 p. 208) eingeführt. Ich kann sie nur auf das Beste empfehlen. Sie wird so langsam hart, dass man die Objekte in aller Ruhe darin hinlegen und ordnen kann. Allerdings ist das auch vom Uebel, wenn man die Präparate schon gleich nach dem Einschluss mit einer Oelimmersion studiren[2]) muss: im Winter dauert es 1 Monat, bevor sie dazu hart genug werden, während der Alkoholbalsam schon in ein paar Tagen die

[1]) Auch dies ist beim Terpentin nach Vosseler nicht der Fall. [M.]

[2]) Vosseler (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 297) legt, um dem Verschieben des Deckglases vorzubeugen, ein heisses Stück Draht nach einander der Länge nach an zwei oder an alle vier Seiten des Deckglases an: das flüssige Harz kommt hier sofort ins Kochen und erstarrt nachher gleich; die Schnitte sollen darunter nicht leiden. [M.]

richtige Härte erlangt. — Kleinenberg und Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. 1880 p. 24) warnen vor dem absoluten Alkohol zur Lösung: die Präparate sind erst schön, verderben aber bald, da sich darin Kristalle oder amorphe Massen ausscheiden. Die Lösung in Terpentinöl hingegen bleibt völlig klar, giebt eine sehr gute Definition des Bildes und ist überhaupt so vorzüglich, dass sie eigentlich viel mehr benutzt werden sollte. Namentlich Anfängern darf man sie empfehlen, und, wie schon § 436 angegeben, betrachte ich sie für manche Zwecke als vielleicht das beste und zuverlässigste von allen Einschlussmitteln. Ich mache mir die Lösung so, dass ich in warmes Terpentinöl (im Einbettofen) kleine Stücke Kolophonium (eine recht helle Sorte!) werfe, und wenn die Lösung dick genug ist, sie zweimal warm filtrire; das kostet etwa 14 Tage. Die Lösung sollte nicht gar zu dick sein, denn sie wird allmählich doch von selbst etwas dicker.

Rehm (Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1893 p. 387) empfiehlt eine Lösung von 1 Theil Kolophonium in 10 Theilen Benzin zum Einschliessen von Schnitten durch das Nervensystem. Wie Nissl erwärmt er über der Flamme den Objektträger so lange, bis alles Benzin verdampft ist, und legt dann erst das Deckglas auf. Auch die Lösung von Kolophonium in Chloroform ist brauchbar.

442. Terpentin nach Vosseler (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 292). Man mischt käuflichen venetianischen Terpentin (von Pinus larix) in einem hohen Cylinder mit dem gleichen Volumen 96 $^0/_0$ igen Alkohols, lässt das Gemisch 3—4 Wochen an einem warmen Orte stehen und giesst es klar ab. Die Präparate kann man direkt aus Alkohol hinein legen. Der Brechungsindex ist niedriger als der der oben erwähnten Harze, und so treten feine Einzelheiten besser hervor. Die Färbungen [1])

[1]) Nicht alle, denn man hat doch namentlich in den ersten Tagen noch den Alkohol im Terpentin, ferner enthält dieser ja an sich schon Terpentinöl, mithin verblassen die Färbungen mit Hämatheïnthonerde leider recht rasch. Aber mit dieser Einschränkung hat Vosseler sein Mittel wohl nicht zu sehr gerühmt. Was es mir am Meeresstrande besonders werthvoll macht, ist seine Eigenschaft, etwas Wasser zu vertragen: man braucht, wie schon Vosseler hervorhebt, die Objekte gar nicht erst in ein Vorharz zu bringen und nicht einmal sorgfältig zu entwässern, vermeidet daher auch bei ganzen Thieren unliebsame Schrumpfungen. Nach Vosseler kann man Celloidinschnitte direkt aus 96 $^0/_0$ igem Alkohol einlegen, ebenso die mit Eiweissglycerin aufgeklebten Paraffinschnitte direkt nach dem Wegschaffen des Paraffins, da die Spur Glycerin im Terpentin keine Trübungen hervorruft. [M.]

leiden nicht in Terpentin, und Vosseler erwähnt, dass seine damals 15 Jahre alten Präparate sich ausgezeichnet darin gehalten haben.

Auch Suchannek (Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1891 p. 463) empfiehlt diesen Terpentin; er nimmt zur Lösung das gleiche Volumen neutralen absoluten Alkohols (käuflicher absoluter Alkohol wird mit geglühtem Kupfervitriol und gebranntem Kalk behandelt), schüttelt das Gemisch öfter um und lässt es dann 1—2 Tage in einem Kachelofen stehen, bis es ganz klar und dick genug geworden ist.

443. Kopalfirniss. Ich habe Präparate darin eingeschlossen gesehen, die recht gut waren, aber meine eigenen Versuche sind fehlgeschlagen.

444. Cedernöl. Kann ich nicht nur als Medium für zeitweilige Beobachtungen, sondern auch zu dauerndem Einschluss aufs Wärmste empfehlen (s. oben p. 233). Auch Israel (Arch. Path. Anat. 105. Bd. 1886 p. 171) verwendet eingedicktes Cedernöl statt Balsam.

445. Rizinusöl. Wurde von Grenacher (Abh. Nat. Ges. Halle 16. Bd. 1886 p. 215; Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 244) für Schnitte von Cephalopodenaugen empfohlen, da der niedrige Brechungsindex (n = 1.49, bei Kanadabalsam = 1.54) die Sichtbarkeit der stärker brechenden Gewebe erhöhen würde. Ich selber habe an anderen Objekten keine guten Resultate erzielt. S. übrigens oben § 253.

446. Photographischer Negativlack nach Weigert (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 209) zum Einschliessen grosser Schnitte ohne Deckglas.

447. Styrax und Liquidambar. S. Fol, Lehrbuch p. 141, ferner Bull. Soc. Belge Micr. 1884 p. 178 und Journ. R. Micr. Soc. London f. 1883 p. 741; f. 1884 p. 318, 475, 655, 827; auch Witt in: Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 196. Sie brechen das Licht sehr stark, taugen daher im Allgemeinen für histologische Zwecke nicht.

448. Sandarak nach Frey (Mikroskop 6. Aufl. Leipzig 1887 p. 134). In absolutem Alkohol gelöst. Keller (Zeit. Wiss. Z. 33. Bd. 1879 p. 333) verwendet eine solche Lösung zum Einlegen von Eiern, die noch von allen Seiten beobachtet werden sollen, also gerollt werden müssen.

Nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. 1880 p. 24) erhalten die Präparate im Laufe der Zeit Luftblasen und blättern zuletzt ganz ab.

20. Kapitel.

Kitte und Firnisse.

449. Allgemeines. Dank dem Eifer der Dilettanten giebt es in der Literatur eine reichliche Menge von Rezepten für Kitte und Firnisse. Von diesen habe ich nur die aufgenommen, die mir nützlich erschienen. dagegen alle, die nur auf Schönheit abzielen, ausgelassen. Zwei oder höchstens drei genügen wahrscheinlich überhaupt schon, und lange Jahre hindurch bin ich mit Bells Kitt allein ausgekommen. Diesen empfehle ich zugleich als Firniss; ferner ist Goldgrund gut, um runde Zellen zu machen, während der Kautschukkitt von Miller nur dann nöthig wird, wo eine besonders grosse Solidität erforderlich ist. — Zur Anfertigung von Glaszellen dient englischer Marineleim. Nach Carpenter dürfen die Kitte oder Firnisse zum Einschluss von Flüssigkeiten unter keinen Umständen feste Theilchen enthalten; er hat nämlich gefunden, dass sie bei deren Gegenwart wohl einige Wochen oder Monate halten mögen, schliesslich aber doch porös werden und nun der Flüssigkeit die Verdunstung und der Luft den Zutritt erlauben. Jedenfalls muss man die Präparate in flüssigen Medien zuerst mit Glyceringelatine umgeben, bevor man den Kitt aufträgt, denn sonst liegt die Gefahr nahe, dass der Kitt unter das Deckglas dringt (s. § 451 und 452). Ich glaube hingegen, ein absolut sicherer Verschluss für Flüssigkeiten soll noch erfunden werden.

Noch genauere Anweisungen als dieses Kapitel giebt Aubert (in: The Microscope Vol. 11 1891 p. 150; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1891 p. 692); Beck (ibid. p. 338, 368 und ibid. f. 1892 p. 293) sowie die neueste Ausgabe von Behrens, Tabellen zum Gebrauch bei mikrosk. Arbeiten (Braunschweig 1898?).

450. Vergleich der Zähigkeit der Kitte (Behrens in: Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 55; Aubert in: Amer. Month. Micr. Journ. Vol. 6

1885 p. 227; Journ. R. Micr. Soc. London (2) Vol. 6 1886 p. 173). Behrens hält den Bernsteinlack für den besten und ist gegen alle, die Chloroform, Benzol, Aether oder Alkohol enthalten, da sie alle brüchig werden; besser sind die mit Terpentinöl oder Leinöl, daher ist ein guter Asphaltlack auch zu empfehlen. Aubert setzt Millers Kautschukkitt obenan, dann kommt ihm Lovetts Kitt und zuletzt der Zinkweisskitt, der nur $^1/_4$ so zäh sei wie der Kautschukkitt.

451. Papierzellen. Nach meiner Erfahrung umrahmt man Flüssigkeiten am besten wie folgt. Mit 2 Punzen schlägt man aus Papier Ringe von etwa 1 mm Breite aus, die etwa 1 mm kleiner im Durchmesser sind als das Deckglas. Dann befeuchtet man einen Ring mit dem Einschlussmittel, legt ihn auf den Objektträger an der richtigen Stelle auf, füllt die so gebildete Zelle mit dem Einschlussmittel, legt das Objekt hinein, das Deckglas darauf, füllt den Raum zwischen Papier und Rand des Deckglases mit Glyceringelatine an (das geht bequem auf einem Drehtische) und zieht nun, sobald diese erstarrt ist, einen Ring von Bellschem oder einem anderen Kitt darum. Um ganz sicher zu gehen, kann man natürlich auch die Gelatine nach Marsh behandeln (s. folgenden §).

452. Gelatinekitt nach Marsh (Section-cutting, 2. Ed. London 1882 p. 104). 15 g von Nelsons opaque gelatin werden in Wasser eingeweicht, wie gewöhnlich geschmolzen, mit 3 Tropfen Kreosot verrührt und in einem Fläschlein aufgehoben. Der Ring wird damit warm gezogen, und so wie er, was nicht lange dauert, ganz hart und trocken geworden ist, mit einer Lösung von Kaliumbichromat (1 Theil auf 48 Theile Wasser) bepinselt. Am Tageslichte wird die Gelatine unlöslich, und dann mag man Bellschen Kitt herum ziehen. Diese Methode ist besonders gut für Umrahmung von Glycerin-Präparaten.

453. Kitt von Bell. Zusammensetzung unbekannt; zu haben bei J. Bell & Co. in London (Oxford Street 338) oder bei Grübler & Hollborn in Leipzig. Fliesst leicht aus dem Pinsel und erstarrt rasch, ist löslich in Aether oder Chloroform, wird von Cedernöl nicht angegriffen. Für Flüssigkeiten ist es der beste Kitt, den ich kenne.

454. Kautschukkitt von Miller. Genauere Zusammensetzung unbekannt. Sehr zäh, trocknet rasch. Lässt sich mit einem Gemisch gleicher Theile von Chloroform und starkem Alkohol verdünnen (Rousselet in: Journ. Quekett Micr. Club (2) Vol. 6 1895 p. 12).

455. Kitt von Clarke. Zu haben bei J. Bolton in Birmingham (Balshall Heath Road 25). Mir sehr empfohlen von Rousselet; er sei für spirituöse Flüssigkeiten der beste, aber für wässerige nicht absolut dicht.

456. Asphaltlack. Ohne Zweifel einer der besten Kitte oder Firnisse, wenn er gut ist. Zu haben bei Grübler & Hollborn. Kitton (Month. Micr. Journ. London Vol. 11 1874 p. 34) empfiehlt den Asphalt in Benzol zu lösen und etwas Goldgrund zuzufügen.

457. Goldgrund (Gold size). Zu haben bei Grübler & Hollborn. Löslich in Terpentinöl. Gut, wenn er gut ist, und sehr nützlich zur Anfertigung von Kittzellen auf dem Drehtische.

458. Marineleim. Im Handel zu haben. Nach Carpenter ist der beste GK4. Löslich in Aether oder Kalilauge. Dient zum Kitten von Glas auf Glas.

459. Eingedickter Terpentin. Parker (Amer. Month. Micr. Journ. Vol. 2 1881 p. 229) löst venetianischen Terpentin in so viel Alkohol, dass es eine dünne Flüssigkeit giebt, filtrirt diese und dampft sie im Sandbade auf etwa $^{3}/_{4}$ des ursprünglichen Gewichtes ein. Lässt man einen Tropfen der heissen Masse in kaltes Wasser fallen, so muss er beim Herausnehmen ganz hart sein und beim Schlage mit einem spitzen Messer glasig brechen. Csokor (Arch. Mikr. Anat. 21. Bd. 1882 p. 353) verwendet „gewöhnlichen käuflichen verharzten Terpentin", der brüchig und dunkelbraun sein muss, und dem er eventuell, nachdem er ihn geschmolzen hat, etwas verharztes Terpentinöl zufügt, worauf er ihn mehrere Stunden lang auf dem Wasserbade abdunsten lässt. Beide Arten Terpentin dienen zum Verschluss von Glycerin-Präparaten. Man erhitzt das Ende eines Drahtes, das rechtwinklig umgebogen ist (der kurze Schenkel soll so lang wie das Deckglas sein), in der Flamme, stösst es in den Kitt und legt es dann flach auf den Objektträger an den Rand des Deckglases. Ist das überflüssige Glycerin vorher sauber weggewischt worden, so legt sich der Kitt glatt an und wird sofort hart. Er soll ganz sicher schliessen und nie unter das Deckglas treten.

460. Kolophonium und Wachs nach Krönig (Arch. Mikr. Anat. Mikr. 27. Bd. 1886 p. 657). Man schmilzt 2 Theile Wachs und 7 bis 9 Theile Kolophonium zusammen, filtrirt das Gemisch und lässt es erkalten. Beim Gebrauch stellt man das Gefäss in heisses Wasser. Der Kitt wird nicht von Wasser, Glycerin oder Kalilauge angegriffen.

461. Paraffin und Kanadabalsam nach Apáthy (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 171). Gleiche Theile Balsam und Paraffin (von 60° Schmelzpunkt) werden in einer Porzellanschale so lange erhitzt, bis keine Dämpfe von Terpentinöl mehr aufsteigen. Die kalt harte Masse wird beim Gebrauche erwärmt und mit einem Glasstabe oder Messingspatel aufgetragen. Ein Ueberzug genügt. Der Kitt läuft nicht in das Glycerin hinein und springt auch nicht.

462. Paraffin. Zu zeitweiligem Verschlusse brauchbar, wird mit einem gebogenen Drahte (§ 459) aufgetragen.

463. Kanadabalsam oder **Dammar.** Die Zellen, die man damit machen kann, sehen zwar hübsch aus, haben sich mir aber auf die Dauer nicht bewährt.

464. Bernsteinlack. Wird von Behrens (§ 450) wegen seiner grossen Zähigkeit sehr empfohlen. Er stammt von E. Pfannenschmidt in Danzig. Zu beziehen von Grübler & Hollborn.

465. Bernstein- und Kopalfirniss nach Heydenreich (Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 338). Darstellung äusserst komplizirt.

466. Schellackfirniss nach Beale (How to work etc. p. 28). Von Schellack wird in Alkohol eine dicke Lösung hergestellt. Ein wenig Rizinusöl (20 Tropfen auf 30 ccm) soll ihn verbessern. Er ist unzuverlässig, schützt aber jedenfalls die Balsampräparate vor Cedernöl. Eine Methode zur Bereitung reinen Schellacks giebt Witt an (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 199). Schellackkitt für Metall auf Glas s. bei Seaman (Journ. R. Micr. Soc. London f. 1888 p. 520).

467. Siegellack. Grob gepulverter Siegellack wird mit starkem Alkohol gerade bedeckt und bei gelinder Wärme aufgelöst. Dient nur als Firniss, nie als Kitt, da er später brüchig werden kann und dann nicht mehr auf dem Glase haftet. Apáthy (Mikrotechnik 1896 p. 174) umrandet die Glycerinpräparate mit einer dicken Lösung von der „allerfeinsten“ Sorte Siegellack in absol. Alkohol.

468. Tolubalsam nach Carnoy (Biol. cellul. p. 129). Tolubalsam 2 Theile, Kanadabalsam 1 Theil, gesättigte Lösung von Schellack in Chloroform 2 Theile werden gemischt und mit Chloroform bis zur Syrupdicke verdünnt. Soll alle anderen Kitte an Güte übertreffen.

469. Weisser oder **rother Kitt** nach Stieda (Arch. Mikr. Anat. 2. Bd. 1866 p. 435). Besteht aus Terpentinöl, Dammar und Zinkweiss resp. Zinnober, ist aber nach neueren Erfahrungen als Kitt ganz unzuverlässig.

---

21. Kapitel.

Injiciren.

470. Allgemeines. Die Massen zum Injiciren bestehen aus der Farbmasse selber und ihrem Vehikel. Nach der Art des letzteren sind in den folgenden Paragraphen die Formeln geordnet worden.

Bei Injektionen der Gefässe von Wirbelthieren hält man sich mit Vortheil an die meisterhafte Praxis von Robin und Ranvier und event. auch an die ausgezeichneten Vorschriften im Lehrbuch der vergl. mikrosk. Anatomie von Fol. Für Wirbellose (und wenn bei Wirbelthieren ausser den Gefässen auch die Struktur des umgebenden Gewebes studirt werden soll) sind aber Glycerinmassen häufig besser als die Gelatinemassen, die von jenen Autoren hauptsächlich empfohlen werden: als besonders praktisch erscheinen mir die Vorschriften von Beale für Berlinerblau und Glycerin (§ 493 u. 494). Ueberhaupt gewähren die Glycerinmassen den grossen Vortheil, dass sie kalt verwendet werden.

Die Formeln der ganz undurchsichtigen Massen sowie diejenigen, die nur zu gröberen Injektionen (von Leichen etc.) dienen, sind hier absichtlich nicht mehr aufgeführt, da sie das mikroskopische Studium der Gefässe nicht mit Vortheil zulassen.

471. Amylnitrit zum Erschlaffen der Gefässwände höherer Wirbelthiere. (Nach Oviatt & Sargent in: St. Louis Med. Journ. 1886 p. 207; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1887 p. 341.) Die Glycerinmassen, die sonst sehr bequem sind und gute Resultate liefern, verursachen leider bei der Injektion frischer Objekte die Kontraktion der Arterien. In solchen Fällen mag man Amylnitrit verwenden, indem man das Thier erst mit einem Gemisch von Aether und Amylnitrit betäubt und dann mit reinem Amylnitrit tödtet, oder indem man ihm nach der Tödtung mit Amylnitrit Normalsalzwasser nebst etwas Amylnitrit injicirt und dann die Glycerinmasse nachschickt. Auf alle Fälle kann man auch der Masse kurz vor dem Gebrauch ein wenig Amylnitrit zufügen.

Massen mit Gelatine.

472. Gelatine als Vehikel nach Robin (Traité du Microscope Paris 1871 p. 30). Gute Gelatine wird in kaltem Wasser eingeweicht und dann im Wasserbade verflüssigt; man nehme auf 7—10 Theile Wasser nur 1 Theil Gelatine (gewöhnlich macht man die Massen viel zu dick) und setze ihr dann die Farbmassen (s. unten) zu. Gegen Schimmel nützen auf die Dauer auch Kampher und Karbolsäure nicht. Nach Hoyer thut es Chloralhydrat, aber man muss davon wenigstens 2 % nehmen (s. § 479).

473. Glyceringelatine als Vehikel nach Robin (Traité p. 32). In 300 ccm Wasser, worin etwas arsenige Säure gelöst worden ist, löse man 50 g gute Gelatine und setze dann 150 g Glycerin und einige Tropfen Karbolsäure zu. Diese Masse verdirbt nie. Mit beiden Vehikeln (§ 472 und 473) können die Farbmassen, die in 474—476 angegeben sind, kombinirt werden.

Frankl (Zeit. Wiss. Z. 63. Bd. 1897 p. 28) lässt 10—15 Platten Gelatine aufquellen, setzt ihr das gleiche Quantum Glycerin zu, kocht die Masse kurze Zeit, fügt ihr 4—5 g konzentrirte Sublimatlösung zu, giesst sie durch Leinewand, vermischt sie mit einer Lösung von löslichem Berlinerblau (1:20) oder von Karmin (1:20), erwärmt und filtrirt wieder, senkt in die noch halbflüssige Masse einen Thymolkristall und hebt sie so Jahre lang unverändert auf.

474. Karminmasse nach Robin (Traité p. 33). In einem Mörser verreibe man 3 g Karmin mit etwas Wasser und so viel Ammoniak, wie zur Lösung erforderlich ist, setze 50 g Glycerin zu und filtrire. Dann füge man von saurem Glycerin (5 g Essigsäure auf 50 g Glycerin) soviel hinzu, bis eine ganz schwach saure Reaktion eintritt (sehr empfindliches Lakmuspapier, das man anfeuchtet und darüber hält, muss sich röthen). Von dieser Masse setzt man zu den obigen Vehikeln (§ 472 oder 473) 1 Theil auf 3—4 Theile.

475. Ferrocyankupfermasse nach Robin (Traité p. 34). Konzentrirte Lösung von gelbem Blutlaugensalz 20 ccm und Glycerin 50 ccm werden gemischt, ebenso konzentrirte Lösung von Kupfervitriol 35 ccm und Glycerin 50 ccm; beide Gemische werden langsam und unter Umrühren zusammengegossen und kurz vor der Injektion mit dem dreifachen Volumen an Vehikel vermischt.

476. Berlinerblaumasse nach Robin (Traité p. 35). Konzentrirte Lösung von Ferrocyankalium 90 ccm (im Original steht sulfocyanure

de fer!) und Glycerin 50 ccm werden gemischt, ebenso flüssiges Eisenchlorid von 30° Baumé 3 ccm und Glycerin 50 ccm; beide Gemische werden langsam zusammengegossen und mit dem dreifachen Volumen an Vehikel vermischt. Man thut gut daran, einige Tropfen Salzsäure hinzuzufügen.

477. Karmingelatine nach Ranvier (Traité 1. Ed. p. 116). Man weicht 10 g gute Gelatine $^1/_2$ Stunde lang in Wasser ein, bis sie tüchtig gequollen ist, wäscht sie, lässt das Wasser ablaufen und schmilzt sie dann im Wasserbade; dann setzt man unter Umrühren eine Karminlösung hinzu, die man so bereitet, dass man 5 g Karmin mit Wasser anreibt und tropfenweise Ammoniak hinzufügt, bis eine klare Lösung entsteht. Man erhält so, wenn alles ordentlich gemacht ist, etwa 30 ccm rothe Gelatine; noch auf dem Wasserbade neutralisirt man sie, indem man tropfenweise Essigsäure hinzugiebt (1 Theil Eisessig und 2 Theile Wasser; nähert man sich der Neutralisation, so nimmt man die Essigsäure schwächer). Sobald der Geruch nach Ammoniak dem nach Säure weicht, hört man mit dem Zusatz der Essigsäure auf und prüft die Masse unter dem Mikroskop: enthält sie Körnchen von Karmin, so taugt sie nichts. Die perfekte Neutralisation lernt man nur durch die Praxis erreichen, und die vorherige Bestimmung der Menge der Säure ist fehlerhaft, weil das Ammoniak nie gleich stark ist, und auch, weil oft die käufliche Gelatine sauer reagirt. — Die ganz neutrale Masse wird durch ungebrauchten Flanell gepresst.

478. Karminmasse zu neutralisiren. Ville (Gaz. hebdom. Sc. Méd. Montpellier 1882) ist der Ansicht, bei der Lösung von Karmin in Ammoniak werde ein Theil des letzteren gebunden, also nur der Ueberschuss müsse neutralisirt werden. Die Säure in der Gelatine lasse sich durch Auswaschen unter der Wasserleitung etwa 1 Stunde lang, wobei die Gelatine aber ganz unter Wasser bleiben müsse, leicht entfernen. Die Neutralität werde besser als durch den Geruch durch empfindliches violettes Lakmuspapier ermittelt: sobald dieses nur noch ganz langsam blau werde, dürfe man keine Säure mehr zusetzen. (Ville empfiehlt noch andere Arten von Papier zur Entdeckung des Ammoniaks, sowie eine Methode zur Aufbewahrung des Ammoniaks in unveränderter Stärke; s. hierüber das Original dieses Buches auf p. 298.)

479. Karmingelatine nach Hoyer (Biol. Centralbl. 2. Bd. 1882 p. 21). Zu einer konzentrirten Lösung von Gelatine gebe man die „ent-

sprechende“ Menge von Hoyers konzentrirter neutraler Karminlösung (l. c. p. 17) und halte das Gemisch im Wasserbade so lange warm, bis die dunkelviolette Farbe hellviolett wird. Dann füge man $^1/_{20}$ bis $^1/_{10}$ Volumen Glycerin und wenigstens 2 % Chloralhydrat (in konzentrirter Lösung) hinzu. Nach dem Filtriren durch Flanell kann man die Masse in einem offenen Gefässe unter einer Glasglocke aufbewahren.

480. Karmingelatine nach Fol (Zeit. Wiss. Z. 38. Bd. 1883 p. 492). Sie kann trocken beliebig lange aufbewahrt werden; der Zusatz von Chloralhydrat zur feuchten Masse schützt nach Fol nicht genug.

1 Kilogramm von Simeons Gelatine für Photographen (kann direkt von der Fabrik in Winterthur bezogen werden; die weichere Sorte ist besser; wahrscheinlich eignen sich auch aus anderen Fabriken gute Sorten für Photographen) weicht man in wenig Wasser etwa 2 Stunden lang ein, lässt das Wasser ablaufen, schmilzt die Gelatine auf dem Wasserbade und rührt langsam 1 Liter konzentrirter Lösung von Karmin in Ammoniak darunter. (Zur Lösung verdünnt man 1 Theil starkes Ammoniak mit 3—4 Theilen Wasser, löst darin möglichst viel Karmin und filtrirt direkt vor der Verwendung das ungelöste Karmin ab.) Dann giebt man zu dem Gemisch, das stark nach Ammoniak riecht, in bekannter Weise Essigsäure, bis die Farbe blutroth wird. Genau zu neutralisiren ist nicht nöthig. Die Masse wird nun bei Seite gestellt, bis sie hart ist, und in Stücke geschnitten; diese bindet man in groben Tüll oder ein feines Netz und treibt sie durch kräftiges Drücken mit der Hand unter angesäuertem Wasser ($^1/_{1000}$ Essigsäure, sonst wäscht sich das Karmin heraus; s. Journ. R. Micr. Soc. London (2) Vol. 4 1884 p. 474) durch die Maschen in Gestalt von feinen Nudeln, die man noch mehrere Stunden lang in einem Siebe unter fliessendes Wasser stellt, um ja jede Spur von Ammoniak oder Säure zu entfernen. Dann schmilzt man die Nudeln wieder, giesst die Masse auf Pergamentpapier, das mit Paraffin getränkt ist, und hängt die Bogen an einem luftigen Orte zum Trocknen auf. Ist sie trocken, so lässt sie sich leicht vom Papier ablösen, in lange Streifen schneiden und, vor Staub und Feuchtigkeit geschützt, aufbewahren. Will man sie verwenden, so braucht man sie nur einige Minuten in Wasser aufzuweichen und im Wasserbade zu schmelzen.

Ohne ein sehr viel schlechteres Resultat kann man den Prozess auch vereinfachen (Fol, Lehrbuch p. 13). In der oben angegebenen Karminlösung weicht man Gelatineplatten 2 Tage lang ein, wäscht

sie ab, legt sie auf einige Stunden in das mit Essigsäure angesäuerte Wasser, wäscht sie auf einem Siebe mehrere Stunden lang unter der Wasserleitung, trocknet sie auf dem Pergamentpapier und hebt sie, wie gemeldet, auf.

Diese Injektionsmasse wird sehr gerühmt.

481. Karmingelatine nach Gerlach (Arch. Mikr. Anat. 1. Bd. 1865 p. 148; Ranvier, Traité 1. Ed. p. 113); nach Thiersch (ibid.).

482. Berlinerblaugelatine nach Ranvier (Traité 1. Ed. p. 119). Eine konzentrirte Lösung von Eisenoxydsulfat in destill. Wasser wird langsam in eine eben solche von gelbem Blutlaugensalz gegossen, jedoch muss von letzterer ein Ueberschuss bleiben. Man prüft daher, wenn sich das Berlinerblau etwas abgesetzt hat, ob ein weiterer Zusatz der Eisenlösung noch einen Niederschlag giebt. Man filtrirt die Flüssigkeit sammt dem Berlinerblau durch ein Filzsieb, das über einem Trichter mit einem Filter darin angebracht ist. Zuerst läuft gelbe Flüssigkeit ab, dann giesst man nach und nach etwas destillirtes Wasser auf das Sieb, und die hiervon ablaufende Flüssigkeit wird immer mehr bläulich; aber man fährt mit dem Zusatz von Wasser so lange fort, bis — nach einigen Tagen — auch durch das Filter blaue Flüssigkeit geht. Dann taucht man das Sieb umgedreht in destillirtes Wasser, worin sich das jetzt löslich gewordene Berlinerblau ganz lösen wird, wenn man genug Wasser genommen hat.

Diese Lösung kann als solche aufbewahrt oder eingedampft und als Pulver aufgehoben werden. Benutzt man sie ohne weiteren Zusatz zum Injiciren, so muss sie konzentrirt sein und geht dann nie durch die Gefässwände hindurch; man kann sie aber auch mit $^1/_4$ Volumen Glycerin oder endlich mit Gelatine versetzt brauchen. Im letzteren Falle nimmt man auf 25 Gewichtstheile des konzentrirten Blaues 1 Gewichtstheil trockene Gelatine.

Die Gelatine löst man wie gewöhnlich (nach dem Aufweichen in Wasser) in ihrem eigenen Wasser durch Erwärmen, bringt die Lösung von Berlinerblau auf dieselbe Temperatur und giesst sie allmählich unter Umrühren mit einem Glasstabe in jene. Das Präcipitat, das zu Anfang immer entsteht, muss bei weiterem Erwärmen verschwinden, sodass der Glasstab beim Herausnehmen aus der Flüssigkeit keine Klümpchen mehr zeigt (ist das nicht der Fall, so taugt die Gelatine nicht). Dann filtrirt man die Masse durch neuen Flanell und hält sie bis zur Injektion auf dem Wasserbade bei 40° C.

483. Berlinerblaugelatine nach Brücke (Arch. Mikr. Anat. 1. Bd. 1865 p. 87). Man mache a) eine Lösung von gelbem Blutlaugensalz in Wasser, die in 1 Liter 217 g enthält, verdünne b) die käufliche Eisenchloridlösung mit 10 Theilen Wasser, nehme von a und b gleiche Volumina, setze zu jedem 2 Volumina einer kaltgesättigten Lösung von Natriumsulfat und giesse nun unter Umrühren die Eisenlösung in die andere. Dann wasche man auf einem Filter das Präcipitat so lange, bis es blau durchläuft, presse es zwischen Filtrirpapier in einer Presse und trockne es an der Luft. Vom trocknen Blau mache man eine konzentrirte Lösung und versetze diese mit so viel Gelatine, dass die Masse kalt erstarrt.

484. Berlinerblaugelatine nach Thiersch (Arch. Mikr. Anat. 1. Bd. 1865 p. 148). Man bereite zunächst eine Lösung von 1 Theil Gelatine in 2 Theilen Wasser, mische dann a) bei reichlich 30° C. (25° R.) 2 ccm einer konzentrirten Lösung von Eisenvitriol mit 5 ccm dieser flüssigen Gelatine, desgleichen b) 4 ccm einer konzentrirten Lösung von rothem Blutlaugensalz mit 10 ccm der Gelatine und gebe nun zu dieser erst 4 ccm einer konzentr. Lösung von Oxalsäure, dann aber unter Umrühren das Gemisch a und rühre fortwährend bei einer Wärme von 25—30° C. um, bis alles Berlinerblau entstanden ist. Endlich erwärme man die ganze Masse auf dem Wasserbade bis auf etwa 90° C. und giesse sie durch Flanell.

485. Berlinerblaugelatine nach Fol (Zeit. Wiss. Z. 38. Bd. 1883 p. 494). Eine Modifikation der Vorschrift von Thiersch (s. vorigen §). Die fertige Masse wird ähnlich wie bei der Karminmasse von Fol (oben § 480) gewaschen, getrocknet und in Streifen geschnitten.

486. Silbergelatine nach Hoyer (Biol. Centralbl. 2. Bd. 1882 p. 19). Eine konzentrirte Lösung von Gelatine versetze man mit dem gleichen Volumen einer 4 %igen wässerigen Lösung von Höllenstein, erwärme die Masse und füge ein wenig Pyrogallussäure in Wasser gelöst hinzu. Das Silber wird fast augenblicklich reduzirt; dann setzt man Glycerin und Chloralhydrat hinzu wie bei der Karminmasse (§ 479). Die Masse erscheint in den Kapillaren gelb, in den grösseren Gefässen braun, und die Farbe ist haltbar.

487. Silbergelatine nach Ranvier zu Imprägnationen (Traité 1. Ed. p. 123). Konzentrirte Lösung von Gelatine 2—4 Theile, 1 %ige Lösung von Höllenstein 1 Theil.

488. Andere Massen. Grüne Masse nach Robin (Traité p. 37); nach Hoyer (Biol. Centralbl. 2. Bd. 1882 p. 16; durch Mischen einer blauen und einer gelben erhalten); nach Thiersch (Arch. Mikr. Anat. 1. Bd. 1865 p. 149; ebenso). Gelbe Masse (Bleichromat) nach Robin (Traité p. 36); nach Thiersch (Arch. Mikr. Anat. 1. Bd. 1865 p. 149); nach Hoyer (ibid. 3. Bd. 1867 p. 136); nach Fol (Lehrbuch p. 15). Blaue Masse nach Guignet (Journ. Microgr. Paris Tome 13 1889 p. 94); nach Hoyer (Arch. Mikr. Anat. 12. Bd. 1876 p. 649). Weisse Masse nach Harting (Mikroskop 2. Bd. Braunschweig 1866 p. 129; ist Bleikarbonat); nach Frey (ibid. p. 130; ist Baryumsulfat). Braune Masse nach Fol (Zeit. Wiss. Z. 38. Bd. 1883 p. 494). Purpurne Masse nach Miller (Amer. Month. Micr. Journ. Vol. 9 1888 p. 50; Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 361).

Kalte Massen mit Gummi, Glycerin etc.

489. Metagelatine als Vehikel nach Fol (Lehrbuch p. 17). Um das lästige Erwärmen der Gelatine beim Injiciren zu umgehen, verwendet Fol Metagelatine, die auch kalt flüssig bleibt. Man gewinnt sie einfach durch mehrstündiges Erwärmen der Gelatinelösung mit etwas Ammoniak. Man kann ihr die Farben direkt zusetzen oder sie auch mit schwachem Alkohol verdünnen. Die injicirten Gewebe bringt man in starken Alkohol oder Chromsäurelösung, wodurch die Masse hart wird.

490. Karmin und Eiweiss nach Joseph (57. Jahr. Ber. Schles. Ges. Vaterl. Cultur 1880 p. 198). Filtrirtes Eiweiss wird mit 1 bis 5 % Karminlösung versetzt. Die Masse koagulirt durch verdünnte Salpetersäure, Chromsäure oder Osmiumsäure und bleibt in den Capillaren durchsichtig. Sie dient zur Injektion von Invertebraten.

491. Gummi arabicum nach Bjeloussow (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. f. 1885 p. 379). Man nehme 1 Theil Borax, löse ihn in möglichst wenig Wasser, löse ferner 2 Theile Gummi arab. in Wasser zu einem Syrup, mische beide Flüssigkeiten, reibe die durchsichtige, fast unlösliche Masse nach und nach mit gewöhnlichem Wasser an und drücke sie durch feine Leinwand. Man wiederhole Verreiben und Durchpressen, bis man eine Masse ganz ohne Klümpchen erhält. (Ist sie gut gerathen, so muss sie in Alkohol erstarren, aber dabei auf das Doppelte anschwellen.) Diese Masse lässt sich mit allen trockenen Mineralfarben mischen mit Ausnahme von Cadmium- und Kobaltfarben. Nach der Injektion legt man die Präparate in Alkohol, worin, wie gesagt, die Gefässe stark anschwellen und zugleich hart werden. Kaltblüter kann man noch lebend damit injiciren. Aus den angeschnittenen Gefässen fliesst die Masse nicht aus; die Präparate halten

sich in Alkohol gut und lassen sich mit Glycerin durchsichtig machen. Will man dagegen die Masse aus einem Gefässe wegschaffen, so braucht man nur verdünnte Essigsäure anzuwenden, die sie auflöst.

492. Karmin mit Glycerin nach Beale (How to work, p. 95). Man löst 0,3 g Karmin in ein wenig Wasser mit 5 Tropfen Ammoniak, giesst es in 15 g Glycerin und setzt dann allmählich unter Umrühren 15 g Glycerin nebst 8—10 Tropfen Essig- oder Salzsäure (Stärke nicht angegeben) hinzu. Das Gemisch muss blaues Lakmuspapier entschieden röthen (eventuell noch etwas Säure zusetzen!); man giebt zum Schluss 15 g Glycerin, 8 g Alkohol und 24 g Wasser hinzu.

Nach meiner Erfahrung ist die Masse gut, aber Berlinerblau ist besser.

493. Berlinerblau mit Glycerin nach Beale (ibid. p. 93). Man mischt 120 g Wasser mit 30 g Glycerin, löst dann in 30 g dieses Gemisches 0,7 g gelbes Blutlaugensalz, ferner in 30 g $3\,{}^3/_4$ g Tinct. ferri sesquichlorati, setzt letztere Lösung ganz allmählich unter Umschütteln zu ersterer und fügt ebenfalls langsam unter Schütteln den Rest des Wassers und Glycerins sowie 30 g Alkohol von 95 $^0/_0$ hinzu. Die injicirten Präparate sind in Glycerin mit 1 $^0/_0$ Essigsäure aufzuheben, damit das Blau nicht vergeht.

494. Saure Masse nach Beale (ibid. p. 296). Aehnlich der vorigen zu bereiten aus Glycerin 60 ccm, Wasser 30 ccm, Tinct. ferri sesquichl. 10 Tropfen, gelbem Blutlaugensalz 0,2 g, starker Salzsäure 3 Tropfen. Man kann zum Schluss 8 g Alkohol zusetzen. Das Gemisch ist nach meinen Erfahrungen äusserst wirksam, dringt gut ein und fliesst aus angeschnittenen Kapillaren nicht so leicht aus, wie man glauben möchte; auch hält es sich Jahre lang ganz unverändert.

495. Berlinerblau und Glycerin nach Ranvier (Traité p. 120). Lösliches Berlinerblau (§ 482) mit $^1/_4$ Glycerin gemischt.

496. Andere Farbmassen. Irgend eine Farbmasse (§ 488) in Verbindung mit verdünntem oder reinem Glycerin.

497. Gummigutt mit Glycerin nach Harting (Mikroskop, Braunschweig 1866 2. Theil p. 124). Man reibt ein Stück Gummigutt auf einem Teller ab und vermischt diese Farbe mit Glycerin; oder zu einem Gemisch gleicher Theile von Wasser und Glycerin setzt man so viel gesättigte alkoholische Lösung von Gummigutt, dass die Flüssigkeit beim Umschütteln tief gelb wird. Das äusserst fein

präcipitirte Gummigutt bleibt suspendirt. Einen etwaigen Ueberschuss an Alkohol schafft man dadurch weg, dass man die Masse in einer offenen Schale 24 Stunden stehen lässt.

Rein wässerige Massen.

498. Lösliches Berlinerblau. Nach Chabry (Journ. Anat. Phys. Paris 18. Année 1882 p. 503) lösen sich in Wasser etwa 2 % der trockenen Verbindung. Auch in 60 %igem Alkohol ist sie löslich.

499. Lösliches Berlinerblau nach Ranvier (Traité 1. Ed. p. 120). S. § 482. Es extravasirt nicht.

500. Berliner Blau nach W. Müller (Feinerer Bau der Milz. Leipzig 1865 p. 6 u. 14). Zu 1 Volumen einer konzentrirten Lösung von löslichem Berlinerblau fügt man ½—1 Volumen 90 %igen Alkohols; man injicirt die Flüssigkeit sammt dem sehr feinen, sich nur schwer absetzenden Präcipitate.

501. Lösliches Berlinerblau nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 8. Bd. 1888 p. 307). Man mische 10 ccm Liq. ferri sesquichlorati mit 500 ccm Wasser, gebe dies zu einer Lösung von 20 g gelbem Blutlaugensalz in 500 ccm Wasser, lasse 12 Stunden lang absetzen, giesse die Flüssigkeit ab, wasche das Präcipitat auf einem Filter so lange mit destillirtem Wasser, bis dieses dunkelblau durchläuft (1 bis 2 Tage lang), und löse das Blau in etwa 1 Liter Wasser auf.

502. Karminlösung nach Emery (Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. 1880 p. 21). Zu einer 10 %igen ammoniakalischen Lösung von Karmin wird unter Umrühren so lange Essigsäure zugesetzt, bis durch das ausfallende Karmin die Farbe der Flüssigkeit heller wird. Man giesst letztere von dem geringen Präcipitate ab, injicirt sie kalt und legt die Objekte (Fische) sofort in starken Alkohol, damit das Karmin rasch ausfalle. Gewöhnlich sind die Gefässe stark genug gefüllt. Sollen die Kapillaren nicht injicirt werden, so setzt man zur Karminlösung so viel Essigsäure, dass das Karmin zum Theil ausgefällt wird, schüttelt vor dem Injiciren die Flasche tüchtig und lässt dann nur einige Minuten lang absetzen, damit die gröbsten Körner nicht mit in die Spritze gelangen. In den Kapillaren bleibt viel von dem feinen Sediment stecken. und so werden die Venen viel heller roth als die Arterien.

503. Tusche nach Taguchi (Arch. Mikr. Anat. 31. Bd. 1888 p. 565). Chinesische, besser noch japanische Tusche wird auf einem Abziehstein so lange gerieben, bis die Flüssigkeit, auf dünnes Filtrirpapier getropft, nicht mehr verläuft oder keine grauen Ringe um die

Tropfen giebt. Man injicirt so viel, dass die Präparate ganz schwarz aussehen, und legt sie dann in irgend ein Härtgemisch (nicht in reines Wasser). Ich denke, diese Masse ist besonders nützlich für Wirbellose, aber auch für Lymphgefässse, Saftkanäle etc.

Celloidinmassen und andere Massen.

504. Celloidinmasse nach Schiefferdecker (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. f. 1882 p. 201). Für Corrosionspräparate. S. die früheren Auflagen dieses Buches oder Whitman, Methods.

505. Celloidinmasse nach Hochstetter (Anat. Anzeiger 1. Jahrgang 1886 p. 51).

506. Asphaltmasse nach Budge (Arch. Mikr. Anat. 14. Bd. 1877 p. 70).

507. Schellackmasse nach Hoyer (Arch. Mikr. Anat. 13. Bd. 1877 p. 645); s. auch Bellarminow (Anat. Anzeiger 3. Jahrg. 1888 p. 650).

508. Oelfarben nach Hoyer (Internation. Monatschr. Anat. Phys. 4. Bd. 1887 p. 341; Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 80). **Stärke** nach Pansch (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. f. 1877 p. 480, f. 1880 p. 232, 371, f. 1881 p. 76, f. 1882 p. 60, f. 1883 p. 265; s. auch Gage in: Journ. R. Micr. Soc. London f. 1888 p. 1056). **Leinölkitt** nach Teichmann (Journ. R. Micr. Soc. London f. 1882 p. 125, 716, f. 1895 p. 704).

509. Natürliche Injektionen (Robin, Traité p. 6). Um diese zu konserviren, lege man die Organe in ein Gemisch von 1 Theil Liq. ferri sesquichlorati und 10 Theilen Wasser.

Retterer (Journ. Anat. Phys. Paris 24. Année 1888 p. 324; ibid. 30. Année 1894 p. 336) und Zenker (Arch. Path. Anat. 135. Bd. 1894 p. 147) verwenden zu gleichem Zweck Müllers Gemisch 24 Stunden lang; Zenker färbt, um das Blut recht deutlich zu machen, die Präparate mit Biondis Gemisch.

22. Kapitel.

Maceriren und Verdauen.

Maceriren.

510. Methoden zur Dissociation. Mitunter ist es zur genauen Kenntniss der Formen der Elemente eines Gewebes nothwendig, diese Elemente aus ihrer Lage im Gewebe loszulösen und sie nach der Trennung von ihren Nachbarn und von den etwa vorhandenen interstitiellen Kittsubstanzen für sich zu studiren. Häufig genügt hierzu das einfache Zerzupfen mit Nadeln nicht, denn der Kitt ist oft zäher als die Elemente selber, und so werden diese hierbei zerrissen und zerstört. Alsdann muss man zur Maceration greifen, d. h. zur Behandlung mit Mitteln, die den Kitt oder die Elemente, die man nicht studiren will, auflösen oder wenigstens erweichen, zugleich aber die Form der Elemente, die man isolirt haben möchte, konserviren. Sind sie nun gut erweicht, so beendet man die Isolirung entweder durch Zerzupfen oder durch Schütteln in einem Reagensglase mit etwas Flüssigkeit, oder durch Klopfen — und gerade letzteres giebt häufig. z. B. bei manchen Epithelien, so gute Resultate, wie sie sich auf keine andere Art erreichen lassen. Man bringt nämlich das macerirte Gewebe auf einen Objektträger, legt ein Deckglas darauf, das man an allen 4 Ecken durch sogenannte Wachsfüsse, d. h. Kügelchen von weichem Wachs, unterstützt, und klopft nun mit einer Nadel sanft auf dem Deckglas umher, sodass dieses allmählich heruntergedrückt wird und die Zellen des Gewebes auseinander drängt. Ist dies zur Genüge geschehen, so setzt man das Einschlussmedium zu und umrahmt das Präparat. (S. auch § 201.)

Man vernachlässige diese einfache Methode, die doch eine der wichtigsten ist, ja nicht. Das Material zu den Wachsfüssen macht man sich übrigens nach Vosseler (Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1891 p. 461) durch Schmelzen von weissem Wachs und Hineinrühren von $^1/_2$—$^2/_3$

seines Gewichtes an venetianischem Terpentin. Wenn man sich hierzu einer offenen Flamme bedient, so sei man vorsichtig, da die Dämpfe von Terpentinöl sich leicht entzünden.

511. Jodserum. Seine Zubereitung s. § 387. Zur Maceration darin legt man ein Stückchen des Gewebes, kleiner als eine Erbse, in ein gut geschlossenes Gefäss mit 4—5 ccm Serum, das nur schwach mit Jod versetzt ist. Gewöhnlich kann man schon nach 24 Stunden mit Erfolg zerzupfen oder zerklopfen (s. § 510); falls nicht, so muss man länger maceriren, dann aber auch jedesmal etwas Jod zusetzen, so oft, wie das Serum (in Folge der Absorption des Jods durch die Gewebe) blass wird. Bei dieser Vorsicht kann man die Maceration einige Wochen lang fortsetzen.

Es versteht sich von selbst, dass diese Methode nur auf frische Gewebe passt, wobei das Jod durch schwaches Härten des Protoplasmas als Fixirmittel wirkt.

512. Künstliches Jodserum (§ 389). Ranvier (Traité 1. Ed. p. 77) hat damit beim Maceriren keinen Erfolg gehabt.

513. Alkohol. Ranvier (Traité 1. Ed. p. 241) verwendet den sogenannten Drittelalkohol, d. h. Alkohol von 90 % 1 Theil mit 2 Theilen Wasser verdünnt, der nach ihm rascher wirkt als Jodserum. Epithelien maceriren in 24 Stunden völlig darin. Man kann auch stärkeren Alkohol (gleiche Theile von Alkohol und Wasser) oder schwächeren (1/4 Alkohol, z. B. zur Isolirung der Fasern in der Retina nach Thin in: Journ. Anat. Phys. London Vol. 13 1879 p. 139) anwenden, indessen stimmen alle Forscher darin überein, dass der Drittelalkohol zum Maceriren ganz ausgezeichnet ist. List (Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 511) will ihn allerdings für Drüsen nur mit Vorsicht angewandt wissen, da er in den Zellen Quellungen hervorrufe; hier wirke Müllers Gemisch oder Osmiumsäure besser.

514. Salzlösung. Gut bekannt und werthvoll ist die 10 %ige Lösung von Kochsalz.

E. Ballowitz (Zeit. Wiss. Z. 50. Bd. 1890 p. 329) fixirt die Spermatozoen mit Dämpfen von Osmiumsäure, macerirt sie entweder nachher oder auch frisch in Kochsalzlösung (0,8—10 %) und färbt sie mit Gentianaviolett. S. auch K. Ballowitz in: Internation. Monatschr. Anat. Phys. 11. Bd. 1894 p. 218 und E. Ballowitz ibid. p. 245.

515. Kochsalz und Alkohol nach Moleschott & Borme (Unters. z. Naturl. 11. Bd. 1872 p. 99; Ranvier, Traité 1. Ed. p. 242): 5 Volumina der 10 %igen Lösung von Kochsalz mit 1 Volumen absoluten Alkohols gemischt. Für Flimmerepithel ist dies Gemisch nach Ranvier nicht so gut wie der Drittelalkohol.

516. Formaldehyd nach Gage (Proc. Amer. Micr. Ass. Vol. 17 1896 p. 328). 1000 Theile Normalsalzwasser und 2 Theile Formol sollen rasch wirken und doch die Zersetzung einige Zeit verhindern.

517. Chloralhydrat. In etwa 2—5 %iger Lösung macerirt es milde und konservirt dabei zarte Gewebe sehr gut. Lavdowsky (Arch. Mikr. Anat. 12. Bd. 1876 p. 359) empfiehlt es für Speicheldrüsen, Hickson (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 25 1885 p. 244) für die Retina der Arthropoden.

518. Kali- oder Natronlauge. Beide Lösungen müssen nach Moleschott stark sein, nämlich 35—50 %, um die Form der Zellen nur wenig zu verändern (nach M. Schultze Kalilauge 28—40 %, Natronlauge 20—22 %); schwach hingegen zerstören sie alle Zellen. (Immerhin lassen sich die schwachen zum Dissociiren der Zellen der Epidermis, Haare und Nägel gebrauchen.) Mit den starken Lösungen behandelt man ganz einfach die Gewebe auf dem Objektträger, und will man daraus Dauerpräparate gewinnen, so neutralisirt man die Kalilauge mit Essigsäure, die damit das wohlbekannte Einschliessmittel Kaliumacetat bildet (Behrens, Kossel & Schiefferdecker, Das Mikroskop, 1. Bd. 1889 p. 156). Oder man setzt statt der Essigsäure direkt 60 %ige Lösung von Kaliumacetat (auch wohl noch mit 1 % Essigsäure vermischt) in reichlicher Menge zu und schliesst die Präparate entweder hierin oder in Glycerin oder Glyceringelatine ein, kann sie auch färben, wenn man das Kaliumacetat durch 24 stündige Behandlung mit Alaunlösung entfernt hat (Gage in: Proc. Amer. Ass. Micr. Vol. 11 1889 p. 36; Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 349).

519. Sulfocyanammonium oder **-kalium** nach Stirling (Journ. Anat. Phys. London Vol. 17 1883 p. 208). Eine 10 %ige Lösung 24—48 Stunden lang für Epithel. Soulier (Trav. Inst. Z. Montpellier (2) Tome 2 1891 p. 171) hat dagegen gute Resultate nur durch Mischen mit einem Fixirmittel erhalten, besonders mit dem Gemisch von Ripart & Petit, aber auch mit Sublimat, Müllerschem Gemisch etc. Andererseits wirkt

das Gemisch von Ripart & Petit gut im Verein mit dem künstlichen Serum von Kronecker oder mit Pepsin, Eau de Javelle, 10 %iger Lösung von Natriumsulfat oder 1 $^1/_2$ %iger Natronlauge. Ueberhaupt soll man durch richtiges Kombiniren eines Macerirgemisches, z. B. der Kochsalzlösungen, der Kali- oder Natronlauge etc., mit den gegebräuchlichen Fixirmitteln stets zu einem „wirksamen Dissociirgemisch" gelangen.

520. Künstlicher Speichel nach Calberla (Arch. Mikr. Anat. 16. Bd. 1879 p. 471) für embryonale Muskeln und Nerven. Man löse 4 g Chlorkalium, 3 g Chornatrium, je 2 g Natriumphosphat und Chlorcalcium in 1 Liter Wasser, sättige die Flüssigkeit mit Kohlensäure und verdünne sie mit 1 Liter Wasser und $^1/_2$ Liter Müllerschem Gemisch (oder 2 $^1/_2$ %iger Lösung von neutralem Ammoniumchromat). Am besten sättigt man mit der Kohlensäure kurz vor dem Gebrauche. Die Gewebe zerzupft und zerschüttelt man im Speichel und schliesst sie in Kaliumacetat ein.

521. Gemisch von Landois (Arch. Mikr. Anat. 25. Bd. 1885 p. 445). Von gesättigter Lösung von neutralem Ammoniumchromat, von Kaliumphosphat und von Natriumsulfat je 5 Theile, destillirtes Wasser 100 Theile. Man macerirt darin kleine Stücke 1—3, sogar 4—5 Tage und legt sie darauf in ein Gemisch gleicher Theile von Ammoniakkarmin und obigem Gemisch.

Gierke empfiehlt es für jegliches Gewebe, speziell aber für das Centralnervensystem, wofür es besser sei als irgend ein anderes Reagens. Auch Nansen (Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 242) empfiehlt es dafür.

522. Kaliumhypermanganat. Es wirkt ähnlich der Osmiumsäure, aber energischer. Allein oder mit Alaun soll es die Fasern der Cornea am besten dissociiren (Rollett in: Strickers Handbuch p. 1108).

523. Chromsäure. Gewöhnlich als Lösung von 1 : 5000 verwandt; besonders gut für Nerven und glatte Muskeln. Für Nerven genügen 24 Stunden; man nimmt auf ein Stück Gewebe von 5 mm Seite etwa 10 ccm Lösung.

524. Kaliumbichromat. In Lösung von $^1/_{500}$. Eisig (Fauna Flora Golf. Neapel 16. Monogr. 1887 p. 297) macerirt die Capitelliden hauptsächlich in $^1/_2$—1 %iger Lösung von Kaliumbichromat Monate, selbst Jahre lang (gegen Schimmel Thymol!) und rühmt dies Mittel sehr.

Er zerzupft die Gewebe in der Lösung, wäscht diese unter dem Deckglas mit $^1/_2$ Glycerin und $^1/_2$ Wasser aus, färbt mit Eosin und schliesst in Glycerin oder das Gemisch von Farrants ein.

525. Müllers Gemisch. Auf $^1/_{10}$ verdünnt. Apáthy (Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 49) macerirt *Ascaris* zur Isolirung der Muskeln in unverdünntem Müllerschem Gemisch Monate lang.

526. Müllers Gemisch und Speichel (s. oben § 520).

527. Gemisch von Brock (Internation. Monatschr. Anat. Hist. 1. Bd. 1884 p. 349). Für das Nervensystem von Mollusken. Gleiche Theile einer 10 %igen Lösung von Kaliumbichromat und Blut des Thieres.

528. Gemische von Möbius (Morph. Jahrb. 12. Bd. 1887 p. 174).

a) 1 Theil Ostseewasser und 4—6 Theile einer $^1/_2$ %igen Lösung von Kaliumbichromat.

b) Die Bestandtheile des Gemisches von Flemming, also $^1/_4$ % Chromsäure, $^1/_{10}$ % Osmiumsäure, $^1/_{10}$ % Essigsäure, aber in Ostseewasser gelöst. Beide für Muscheln aus der Ostsee (also aus salzarmem Seewasser). Man macerirt darin die Gewebe mehrere Tage.

529. Pikrinsäure und Alkohol nach Gage (Proc. Amer. Soc. Micr. Vol. 12 1890 p. 122; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 87). 250 Theile Alkohol von 95 %, 750 Theile Wasser, 1 Theil Pikrinsäure. Besonders gut für Epithelien und Muskeln. Einige Stunden genügen. Wird auch von Hopkins (ibid. p. 167) gerühmt.

530. Osmiumsäure und Essigsäure nach Hertwig (Nervensyst. etc. Medusen Leipzig 1878 p. 5; Jena. Zeit. Naturw. 13. Bd. 1879 p. 462). Gleiche Theile einer $^1/_{20}$ %igen Osmiumsäure und einer $^1/_5$ %igen Essigsäure. Die Medusen werden auf 2—3 Minuten hineingelegt, dann mit $^1/_{10}$ %iger Essigsäure zur Entfernung der Osmiumsäure gewaschen, auch 1 Tag lang darin gelassen, in Beales Karmin gefärbt und in Glycerin aufbewahrt. Für Aktinien nimmt man nur $^1/_{25}$ %ige Osmiumsäure und löst diese sowie die Essigsäure in Seewasser, wäscht ferner in $^1/_5$ %iger Essigsäure aus. Ist die Maceration beendet, so färbt man mit Pikrokarmin, sonst mit Beales Karmin.

531. Gemisch von Haller (Morph. Jahrb. 11. Bd. 1886 p. 321). 1 Theil Eisessig, 1 Theil Glycerin, 2 Theile Wasser. Besonders gut für das Nervensystem der rhipidoglossen Schnecken. 30—40 Minuten genügen; die Zellen sind weniger geschrumpft als in anderen Gemischen.

532. Salpetersäure. Die 20 %ige Säure ist sehr gut für Muskeln. Nach 24 Stunden schüttelt man das Objekt mit Wasser in einem Reagensglase und findet dann bereits die Fasern isolirt. Nachher wäscht man die Präparate mit Wasser aus und kann sie in starker Alaunlösung lange Zeit aufbewahren (Gage in: Proc. Amer. Soc. Micr. Vol. 11 1889 p. 38; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 86). S. auch § 668.

Die Maceration geht in der Wärme viel rascher vor sich, bei 40—50° C. genügt oft schon 1 Stunde (Gage).

533. Salpetersäure und Kaliumchlorat (Kühne, Ueber die peripher. Endorgane Leipzig 1862 p. 6; Ranvier, Traité 1. Ed. p. 79). Etwas Kaliumchlorat übergiesst man in einem Uhrglase mit dem 4fachen Volumen Salpetersäure, begräbt ein Stückchen Muskel darin auf 1/2 Stunde und schüttelt es dann mit Wasser in einem Reagensglase, um die Fasern ganz zu isoliren.

534. Salpetersäure und Essigsäure nach Apáthy (Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 49). 3 Volumtheile Eisessig, 3 Salpetersäure, je 20 Wasser, Glycerin und absol. Alkohol. Blutegel werden darin 24 Stunden lang macerirt und dann direkt in 70 %igen Alkohol gebracht, worin sie aufquellen; nach 24 Stunden in 50 %iges Glycerin, das so oft gewechselt wird, wie es noch sauer reagirt. So lassen sich die Nerven vom Bauchstrang bis zur Haut im Zusammenhang isoliren. (S. auch Apáthy in: Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1897 p. 728.)

535. Schwefelsäure (Ranvier, Traité 1. Ed. p. 78). In 0,6 %iger Lösung von M. Schultze (Abh. Nat. Ges. Halle 7. Bd. 1863 p. 90) zum Studium der Nasenschleimhaut empfohlen: 3—4 (aber auch 1—10) Tropfen konzentrirter Schwefelsäure auf 30 ccm Wasser. Auch für die Fasern der Kristalllinse, die Stäbchen der Retina etc. Nach Odenius (Arch. Mikr. Anat. 2. Bd. 1886 p. 463) ist sehr schwache Säure das beste Mittel für die Nervenenden in Tasthaaren: man macerirt die Haarfollikel 8—14 Tage darin. — Heisse konzentrirte Säure isolirt verhornte Gewebe (Horn, Haare, Nägel) gut. S. auch § 795 (Knochen) und 831 (Mollusken).

536. Oxalsäure nach M. Schultze (Abh. Nat. Ges. Halle 7. Bd. 1863 p. 89). In ganz oder halb konzentrirter Lösung zur Maceration der Nasenschleimhaut von Wirbelthieren, um die Nervenenden zu isoliren.

537. Methylgemisch nach Schiefferdecker (Arch. Mikr. Anat. 28. Bd. 1886 p. 305) für die Retina. 10 Theile Glycerin, 1 Theil Methylalkohol, 20 Theile dest. Wasser. Das ganz frische Gewebe macerirt man einige Tage lang darin.

538. Lysol nach Reinke (Anat. Anzeiger 8. Jahrg. 1893 p. 532). Lysol (eine Lösung der Kresole des Theeröls in neutraler Seife) soll als 10 %ige Lösung in Wasser oder in Wasser, Alkohol und Glycerin sehr rasch maceriren, z. B. schon in wenigen Minuten die Rindenzellen der Haare, fast augenblicklich die Epithelzellen von *Salamandra*.

Verdauen.

539. Gemisch von Beale (Arch. of Med. Vol. 1 1858 p. 296). Der Saft aus den Magendrüsen des Schweines wird rasch auf Glasplatten getrocknet, pulverisirt und in gut verschlossenen Flaschen aufbewahrt. Hält sich Jahre lang. (1 Theil löst etwa 120 Theile coagulirtes Eiweiss auf.) Man löst das Pulver in destill. Wasser und filtrirt, was leicht geht, oder löst es in Glycerin. Man digerirt die Objekte in der Lösung bei 37 ° C. einige Stunden lang.

540. Gemisch von Brücke (Carnoy, Biologie cellul. p. 94). Glycerinextrakt vom Schweinemagen 1 Volumen, $^1/_5$ %ige Salzsäure 3 Volumina, dazu etwas Thymol.

541. Gemisch von Bikfalvi (Centralbl. Med. Wiss. 21. Jahrg. 1883 p. 436, 833). 1 g mit Alkohol behandelter und getrockneter Mucosa des Magens vom Hunde wird mit 20 ccm $^1/_2$ %iger Salzsäure 3—4 Stunden in einem Brütofen digerirt und dann filtrirt. Das Objekt macerirt man in dieser Flüssigkeit $^1/_2$ bis höchstens 1 Stunde lang.

542. Gemisch von Kuskow (Arch. Mikr. Anat. 30. Bd. 1887 p. 32). Man löst 1 Theil Pepsin in 200 Theilen einer 3 %igen Oxalsäure und bringt das Objekt gleich hinein; Schnitte von gehärtetem Ligamentum nuchae sind bei gewöhnlicher Temperatur in 10—40 Minuten digerirt.

543. Gemisch von Schiefferdecker (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 483). Man macht eine gesättigte Lösung von Pankreatin (P. siccum von Dr. Witte in Rostock) in Wasser, filtrirt sie und digerirt Stücke der Epidermis 3—4 Stunden lang darin bei etwa 37 ° C. Die Kerne konserviren sich gut, und auch die Form der Stachel- und Riffzellen bleibt erhalten.

544. Trypsin nach Kühne (Unters. Phys. Inst. Heidelberg 1. Bd. 1878 p. 219). Sehr komplizirt.

545. Methoden von Gedoelst (La Cellule Tome 3 1887 p. 117, Tome 5 1889 p. 126; Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 57).

546. Methode von Hoehl zur Demonstration des adenoiden Gewebes (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. 1897 p. 136). Paraffinschnitte, mit Wasser aufgeklebt, werden 10—24 Stunden lang bei 20—37° C. in einer schwach alkalischen (0,3 % Soda) $^1/_5$—$^2/_5$ %igen Lösung des Pankreatinfermentes von Mall (oder von E. Merck in Darmstadt) macerirt, 10—20 Minuten unter der Wasserleitung vorsichtig ausgewaschen und mit Eisenhämatoxylin oder mit Orceïn nach Unna etc. gefärbt.

23. Kapitel.

Korrodiren, Entkalken, Entkieseln, Bleichen.

Korrodiren.

547. Kalilauge, Natronlauge, Salpetersäure. Kochen oder langes Einweichen in einer starken Lösung von einem dieser drei Reagentien ist ein wirksames Mittel zur Entfernung der Weichtheile vom Skelette bei Arthropoden, Schwämmen etc.

548. Eau de Javelle (Kaliumhypochlorit) nach Noll (Z. Anzeiger 5. Jahrg. 1882 p. 528). Da die gewöhnliche Art, das Skelett von Kieselschwämmen durch Wegbeizen der Weichtheile mit Kalilauge zu präpariren, manche Nachtheile mit sich bringt und namentlich die Spicula nicht in ihrer natürlichen Lage erhält, so lässt man ein Stückchen des Schwammes auf dem Objektträger so lange in einigen Tropfen Eau de Javelle liegen, bis sich alle Weichtheile gelöst haben. Dies ist bei dünnen Stücken in 20—30 Minuten der Fall. Dann bringt man vorsichtig Essigsäure hinzu, um die etwaigen Niederschläge aufzulösen, und führt zum Schlusse das Präparat durch Alkohol etc. in Balsam über. — Auch für Kalkschwämme soll diese Methode geeignet sein. Ich meine aber, zarte Gewebe werden darunter leiden oder wohl gar zerstört werden.

549. Eau de Labarraque (Natriumhypochlorit) kann in ähnlicher Weise verwandt werden. Nach Looss (Z. Anzeiger 8. Jahrg. 1885 p. 333) lösen beide Flüssigkeiten Chitin in der Wärme rasch auf. Man nimmt dazu die käufliche Lösung konzentrirt (s. unten § 569) und bringt sie zum Kochen. Verdünnt man sie hingegen mit dem 4—6fachen an Wasser und macerirt darin die chitinösen Gewebe 24 Stunden oder länger je nach der Grösse, so wird das Chitin nicht aufgelöst, wohl aber durchsichtig, weicher und auch für wässerige oder alkoholische Färbmittel durchlässiger. Dabei sollen so feine Dinge

wie Nervenenden nicht leiden. Auch ist die Methode verwendbar für Nematoden und ihre Eier, die ja sonst so resistent sind, ferner zur Auflösung der Gallerte um die Eier der Amphibien (§ 590) u. s. w.

550. Korrosion nach Altmann (Arch. Mikr. Anat. 16. Bd. 1879 p. 471). Ueber Injektionen für Korrosionspräparate s. Rejsek (Bibliogr. Anat. Paris 4. Année 1897 p. 229).

Entkalken.

551. Allgemeines. Man nehme stets nur wirklich gut fixirte und gehärtete Gewebe und verlasse sich nicht so sehr auf Reagentien, von denen es heisst, sie entkalkten und härteten frische Gewebe zugleich.

Rousseau (Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 207) bettet vor dem Entkalken die sorgfältig fixirten Gewebe (höchstens 2 cm grosse Stücke) in Celloidin ein, bringt sie dann in 85 %igen Alkohol und entkalkt sie in einem sehr sauren Gemisch von Salpetersäure (15—40 Th. HNO_3 von 1,4 spez. Gew.) und Alkohol (100 Th.), entsäuert sie in Alkohol durch Zusatz von präcipitirtem Calciumkarbonat, wäscht sie nochmals mit Alkohol und schneidet sie. Die Methode eignet sich für Poriferen, Korallen, Echinodermen etc. Die Gewebe sollen dabei histologisch durchaus gut erhalten bleiben.

552. Entkalken von Knochen. Ich berichte hierüber kurz nach Busch (Arch. Mikr. Anat. 14. Bd. 1877 p. 481), verweise aber auch auf Haug (Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 1) und besonders auf Schaffer (ibid. 10. Bd. 1893 p. 175). S. auch unten § 794 ff.

Am gebräuchlichsten ist Salzsäure. Sie wirkt selbst in starker Verdünnung rasch, bringt aber die Gewebe bedenklich zum Schwellen. Man setzt, um dem abzuhelfen, wohl Chromsäure oder Alkohol zu oder löst (nach Ebner) in einer 3 %igen Säure 10—15 % Kochsalz. (Waldeyer nimmt 10 Volumina einer $^1/_{10}$ %igen Lösung von Chlorpalladium und 1 Volumen Salzsäure.) Nach gründlichem Auswaschen mit Wasser neutralisirt man noch den Rest der Säure mit schwachem Ammoniak oder schwacher Sodalösung.

Chromsäure wird zwar auch oft verwandt, enkalkt aber langsam und bringt die Gewebe sehr zum Schrumpfen. Daher sollte man sie auch nie stärker als 1 %ig nehmen und bei zarten Geweben noch schwächer. Phosphorsäure ist für junge Knochen empfohlen worden.

Essigsäure, Milchsäure und Holzessig entkalken zwar gut, verursachen aber starke Quellungen. Pikrinsäure wirkt sehr langsam und eignet sich nur für ganz kleine Objekte.

553. Salpetersäure. Busch (l. c.) zieht allen anderen Reagentien die Salpetersäure vor, da sie keine Quellungen verursacht, sehr wirksam ist und doch die Gewebe nicht ernstlich angreift. Für sehr grosse und zähe Knochen verdünnt man 1 Volumen der reinen Säure von 1.25 spez. Gewicht mit 10 Volumina, für junge Knochen mit bis 100 Volumina Wasser. Frische Knochen kommen zunächst auf 3 Tage in 95 % igen Alkohol, dann auf 8—10 Tage in die Säure, die man aber täglich wechseln muss. Sobald sie ganz entkalkt sind, nimmt man sie heraus, sonst werden sie gelb; man wäscht sie 1—2 Stunden unter der Wasserleitung, bringt sie in 95 % igen Alkohol und erneuert diesen nach einigen Tagen.

Junge oder fötale Knochen bringt man zuerst in eine Lösung von 10 Theilen Kaliumbichromat und 1 Theil Chromsäure in 1000 Theilen Wasser und entkalkt sie dann in 1—2 % iger Salpetersäure unter Zusatz von $^1/_{10}$ % iger Chromsäure oder 1 % Kaliumbichromat. Legt man sie später in Alkohol, so werden sie bekanntlich grün.

554. Salpetersäure und Alkohol. 70 % iger Alkohol mit 3 % Salpetersäure; man legt die Objekte einige Tage oder Wochen hinein. Ich weiss nicht, wer dieses vorzügliche Mittel zuerst[1]) angegeben hat. Reine Salpetersäure macht auch in der Verdünnung die Knochen leicht gelatinös, während Alkohol (oder Alaun, s. § 555) dem entgegenwirkt.

Thoma (Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 191) bringt die beliebig fixirten oder gehärteten Knochen in ein Gemisch von 5 Volumina 95 % igen Alkohols und 1 Volumen konz. reiner Salpetersäure, das er alle 2—3 Tage wechselt, bis sie ordentlich entkalkt sind, was spätetens in 2—3 Wochen der Fall sein muss. Er wäscht sie dann in 95 % igem Alkohol, der einen Ueberschuss von präcipitirtem Calciumkarbonat enthält, 8—14 Tage lang, d. h. noch einige Tage länger, als blaues Lakmuspapier sich in dem Alkohol nicht mehr röthet. Sie lassen sich dann gut färben und weiter behandeln.

555. Salpetersäure und Alaun nach Gage (Proc. Amer. Micr. Soc. Vol. 14 1892 p. 121; Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 104). Eine gesättigte

---

[1]) Ich brauche schon seit vielen Jahren 5 %ige Salpetersäure in 90 %igem Alkohol und habe dies auch mündlich viel empfohlen. Neuerdings rühmt Gage (s. § 555) sehr 67 %igen mit 3 % Säure. [M.]

Lösung von Alaun verdünnt man mit gleichviel Wasser und setzt zu je 20 ccm davon 1 ccm starke Salpetersäure. Man bringt in dieses Gemisch die Objekte aus Alkohol und wechselt es alle 2—3 Tage, bis die Entkalkung beendet ist. Zähne soll es vielleicht besser entkalken, als Alkohol mit Salpetersäure. Der Alaun wirkt der Quellung entgegen, die nach Gage die Salpetersäure allein hervorrufen würde.

556. Salzsäure (s. auch § 552). Ranvier verwendet sie 50%ig und findet, sie wirkt dann sehr rasch. Zur Verhütung der Quellungen setzt Ebner Kochsalz zu: entweder nimmt er 100 ccm einer gesättigten Lösung, 100 ccm Wasser und 4 ccm Salzsäure, legt die Knochen hinein und fügt jeden Tag noch 1—2 ccm Salzsäure hinzu, bis sie weich sind; oder er verwendet 500 Alkohol, 100 Wasser, 2 $^1/_2$ Kochsalz und 2 $^1/_2$ Salzsäure. Haug (Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 7) räth 70 Alkohol, 30 Wasser, $^1/_2$ Kochsalz und 1—5 Salzsäure an.

557. Salzsäure und Chromsäure nach Bayerl (Arch. Mikr. Anat. 23. Bd. 1884 p. 36). Gleiche Theile einer 3%igen Chromsäure und 1%igen Salzsäure. Für ossifizirenden Knorpel.

558. Salzsäure und Glycerin nach Squire (Methods p. 12) für Zähne. 5 Theile Salzsäure, 95 Theile Glycerin.

559. Pikrinsäure muss man in gesättigter Lösung nehmen. Sie löst aber selbst dann nur wenig Kalk auf, also hat man sie häufig zu wechseln. Natürlich vermeidet man Pikrinschwefelsäure wegen der Bildung von Gips am besten ganz. Dagegen möchten Pikrinsalzsäure oder Pikrinsalpetersäure auf den ersten Blick zum Entkalken sehr gut erscheinen. Indessen macht P. Mayer darauf aufmerksam, dass sie beide sehr rasch wirken, und dass die reichliche Entwicklung von Kohlensäure oft mechanisch die Gewebe verletze; daher werde in vielen Fällen die Chromsäure vorzuziehen sein, besonders da sie das Zusammenfallen der Gewebe verhindert, das die Folge der Entfernung der stützenden kalkhaltigen Elemente sein kann.

560. Phosphorsäure. 10—15% stark (Haug, l. c. in § 552). Wirkt langsam und erschwert das Färben hinterher.

561. Milchsäure. Wenigstens 10% stark. Wirkt ziemlich rasch, konservirt gut, nach Haug (l. c.) empfehlenswerth.

562. Chromsäure verwendet man in der Stärke von $^1/_{10}$%—2% (s. jedoch § 552) und lässt sie auf Knochen 2—3 Wochen einwirken. Man nehme sie zuerst schwach und verstärke sie allmählich. Jedenfalls wirkt sie nur sehr langsam, und man nimmt daher besser ein Gemisch von ihr mit einem energischeren Mittel.

563. Chromsäure und Salpetersäure nach Fol (Lehrbuch p. 112). 70 Theile einer 1%igen Chromsäure, 3 Theile Salpetersäure, 200 Theile Wasser.

564. Arsensäure nach Squire (Methods p. 11). Eine 4%ige Lösung warm (bei 30—40° C.) zu brauchen. S. auch unten § 791 Martinotti.

565. Chromosmiumessigsäure nach van der Stricht (Arch. Biol. Tome 9 1889 p. 29) und Schaffer (Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 179).

Man darf die Objekte Monate lang darin lassen, und wenn man sie Anfangs alle 2 Tage, später langsamer wechselt, so entkalkt sie auch grössere Knochen unter guter Erhaltung der Struktur.

566. Phloroglucin und Salpetersäure (oder Salzsäure) nach Andeer (Centralbl. Med. Wiss. 22. Jahrg. 1884 p. 193, 579; Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 375, 539). Das Phloroglucin allein entkalkt nicht, soll aber die Gewebe vor der Wirkung der Mineralsäuren schützen, sodass diese viel stärker genommen werden können, als sonst rathsam wäre. Die Gemische damit wirken daher sehr rasch. Haug (Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 8) löst 1 g Phloroglucin in 10 g reiner Salpetersäure von 1,4 spez. Gw. langsam und vorsichtig unter leichtem Erwärmen. Die dunkelrothe Lösung wird mit 50 ccm destill. Wasser verdünnt und kann noch bis zu 300 ccm mit 20 %iger Salpetersäure vermischt werden, ohne dass das Phloroglucin seinen Schutz versagt. Bei der ungemein raschen Entkalkung muss man aber gut aufpassen. Fötale und junge Knochen werden in 1/2 Stunde ganz weich, kleine Stücke alter, harter Knochen in einigen Stunden. Zähne erfordern mehr Zeit oder eine Lösung mit 35—40 % Salpetersäure. Man wäscht hinterher 2 Tage lang unter der Wasserleitung aus. Die Gewebe färben sich gut. Statt der Salpetersäure kann man auch 30 % Salzsäure und 1/2 % Kochsalz nehmen.

Zum langsamen Entkalken nimmt man die Salpetersäure nur 2—5 % stark oder auch ein Gemisch von 1 Theil Phloroglucin, 5 Theilen Salpetersäure, 30 Theilen Wasser und 70 Theilen Alkohol.

Ferreri (Bull. Accad. Med. Roma Anno 18 1892 p. 67; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 236) löst (zur Entkalkung des Labyrinthes) 1 g Phloroglucin warm in 100 ccm Wasser und 10 ccm Salzsäure und setzt nach dem Erkalten 200 ccm Alkohol von 70 % hinzu. Das Labyrinth kommt auf 30—40 Tage in die jede Woche zu erneuernde Flüssigkeit und wird später in 70 %igem Alkohol ausgewaschen.

Schaffer (Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 178) räth dazu, das Phloroglucin wegen der Entwickelung salpetriger Säure nur kalt und unter einem Abzugrohr zu lösen. Das Phloroglucin scheine ähnlich der Kochsalzlösung die Gewebe zum Schrumpfen zu bringen, und hierauf beruhe wohl seine gute Wirkung beim Entkalken.

Entkieseln.

567. Flusssäure nach Mayer (Z. Anzeiger 4. Jahrg. 1881 p. 593). Man bringt die Objekte mit dem Alkohol in ein Glas, das innen mit Paraffin ausgekleidet ist (damit es nicht selbst angegriffen werde), und giebt nun tropfenweise Flusssäure hinzu, wobei man sich aber vor deren Dämpfen in Acht nehmen muss, die die Schleimhäute stark reizen. Kleine Stücke von Kieselschwämmen werden in einigen Stunden, höchstens in 1 Tag entkieselt. Die Gewebe leiden nicht darunter.

Ich meine, man könnte bei Schwämmen diese gefährliche Methode ganz gut umgehen. Sind sie nämlich gut eingebettet, so kann man sie auch mit den Nadeln schneiden; wahrscheinlich brechen diese, wenn das Messer sie berührt, mit ganz scharfen Rändern. Natürlich werden die Messer dadurch nicht besser.

Rousseau bettet vor dem Entkieseln die Kieselschwämme in Celloidin ein (ähnlich wie beim Entkalken, s. § 551) und bringt dann (in einer Kautschukdose mit Deckel) den Block von etwa 1 cm Seitenlänge auf 1—2 Tage in ein Gemisch von 50 ccm Alkohol und 20—30 Tropfen Flusssäure; zur Entsäuerung dient Alkohol mit Pulver von Lithiumkarbonat (etwaige Niederschläge werden hinterher durch etwas Salzsäure aufgelöst) oder öfter gewechselter reiner Alkohol.

Bleichen.

568. Freies Chlor nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. 1880 p. 8). Man legt in einen Glastubus einige Kristalle von Kaliumchlorat, giebt 2 oder 3 Tropfen Salzsäure darauf und giesst, wenn sich das grüngelbe Chlor zu entwickeln beginnt, einige ccm Alkohol von 50—70 % hinzu. Nun bringt man die Objekte, die bis dahin in Alkohol von 70—90 % gewesen sind, in den Tubus, worin sie zunächst schwimmen, später aber untersinken. Sie bleichen je nach Umständen in 1/4 Stunde bis 1 oder 2 Tagen, ohne histologisch zu leiden. Nur in hartnäckigen Fällen erwärme man die Flüssigkeit oder nehme mehr Säure. Auch aufgeklebte Schnitte lassen sich in dieser Weise gefahrlos bleichen. Statt der Salzsäure kann man auch Salpetersäure verwenden; dann wirkt der sich entwickelnde Sauerstoff statt des Chlors.

Die obige Methode dient sowohl zur Entfernung natürlicher Pigmente (z. B. in der Haut oder den Augen von Arthropoden) als auch zur Bleichung von Objekten, die in Osmiumgemischen zu schwarz geworden sind (s. § 38), und ist nach neuesten Versuchen von Mayer der Anwendung von Wasserstoffhyperoxyd vorzuziehen (Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 30). Um das Chitin von Insekten

zu bleichen, setzt man zum Kaliumchlorat und zur Salzsäure keinen Alkohol, sondern Wasser (Mayer in: Arch. Anat. Phys. 1874 p. 321). S. auch § 834.

569. Eau de Labarraque. Eau de Javelle (s. § 548 u. 549). Bereitung nach Ciaccio & Campari (Mem. Accad. Bologna (4) Tomo 7 1887 p. 773) durch Einleiten von Chlor in eine in Schnee und Salz stehende 8%ige Natronlauge; enthält etwa 7½% Natriumhypochlorit. Oder einfacher durch Zerreiben von 20 Theilen Chlorkalk (28—30%) mit 100 Theilen Wasser, Zusatz einer Lösung von 25 Theilen Soda in 500 Theilen Wasser und Abgiessen der klaren Flüssigkeit vom Bodensatze 24 Stunden später.

570. Wasserstoffhyperoxyd. Pouchet (s. Duval, Précis p. 234) bringt die Objekte in Glycerin mit etwas Wasserstoffhyperoxyd (5 bis 6 Tropfen auf ein Uhrglas voll). Später haben Unna (Monatshefte Prakt. Derm. 1883) und Solger (Centralbl. Med. Wiss. 21. Jahrg. 1883 p. 177) das Wasserstoffhyperoxyd empfohlen; Solger nimmt es in 3%iger Lösung.

Nach Fürst (Morph. Arb. Schwalbe 6. Bd. 1896 p. 529) macerirt es bei langer Einwirkung. Ueber das Entfernen von Chrom- oder Osmiumfärbungen aus den Geweben s. § 40 und 38.

Natriumhyperoxyd nach Carazzi (Z. Anzeiger 17. Jahrg. 1894 p. 135).

571. Schweflige Säure. Waddington (Journ. R. Micr. Soc. London (2) Vol. 3 1883 p. 185) empfiehlt eine konzentrirte Lösung des Gases in Alkohol zum Bleichen. Nach brieflicher Mittheilung von G. Gilson eignet sie sich sehr zur raschen Entfärbung von Objekten, die mit Kaliumbichromat konservirt worden sind.

572. Natronlauge. Rawitz (Leitfaden Hist. Unters. 2. Aufl. Jena 1895 p. 29) verwendet zum Bleichen des Pigmentes am Mantelrande der Muscheln alkoholische Natronlauge (auf 15—20 ccm Alkohol von 96% 3—9 Tropfen offizinelle Natronlauge).

573. Kaliumhypermanganat und Oxalsäure. Alfieri (Monitore Z. Ital. Anno 8 1897 p. 57) bleicht Celloidinschnitte durch die Chorioidea etc., indem er sie zunächst auf 8—24 Stunden in eine Lösung von Kaliumhypermanganat (1:2000) legt und dann in einer Lösung von Oxalsäure (1:300 oder schwächer) einige Stunden lang entfärbt. S. auch § 38.

574. Salzsäure nach Grenacher (Abh. Nat. Ges. Halle 16. Bd. 1886 p. 214; Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 244) zum Bleichen der Retina von

Cephalopoden in toto. Glycerin 1 Theil und 80%iger Alkohol 2 Theile werden gemischt und mit 2—3% Salzsäure versetzt. Das Augenpigment löst sich hierin.

575. Salpetersäure in Alkohol nach Parker (Bull. Mus. Comp. Z. Harvard Coll. Vol. 13 1887 p. 175; Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 82). Schnittserien durch die Augen von Skorpionen werden, mit Kollodium aufgeklebt, 1 Minute lang in ein Gemisch von etwa gleichen Theilen Salpetersäure und Alkohol oder von je 18 Theilen Salpetersäure und Salzsäure und 65 Theilen Alkohol gebracht. Beim Bereiten dieser Gemische giesse man die Säuren in den Alkohol und halte das Gemisch kühl.

24. Kapitel.

Methoden zu embryologischen Untersuchungen.

576. Künstliche Befruchtung. Dieses Mittel, das die bequemste Möglichkeit zur Erlangung der frühesten Stadien mancher Thiere gewährt, lässt sich sehr leicht bei den anuren Amphibien, den Teleostiern, Cyclostomen, Echinodermen und vielen Würmern und Cölenteraten anwenden.

Handelt es sich um Amphibien, so öffnet man ein Männchen und ein Weibchen, nimmt die Eier aus dem Uterus, bringt sie in ein Uhrglas oder eine Präparirschale und giesst das Wasser, womit man die Hoden, besser noch die Vasa deferentia, des Männchens zerzupft hat. hinzu.

Aus den Weibchen der Knochenfische lassen sich durch sanften Druck auf den Bauch die Eier leicht ausstreichen, ebenso aus den Männchen das Sperma. (Zuweilen, z. B. bei *Gasterosteus*, muss man das Männchen tödten, die Hoden herausschneiden und zerzupfen.) Das Sperma der Fische, besonders der Salmoniden, stirbt in Wasser sehr rasch ab; man giebt es daher am besten direkt zu den Eiern, setzt etwas Wasser hinzu und bringt nach einigen Minuten das Ganze in einen Brütapparat mit fliessendem Wasser.

Mit den Invertebraten geht es ebenfalls sehr leicht. Zuweilen kann man die Befruchtung sogar unter dem Mikroskop vornehmen und so das Eindringen des Samenfadens etc. beobachten, wie es Fol. die Hertwigs, Selenka u. A. gethan haben.

577. Beobachtungen am lebenden Objekte. Die Entwickelung mancher Thiere, besonders einiger Invertebraten, lässt sich einigermassen an den lebenden Eiern unter dem Mikroskope verfolgen. Dies gilt z. B. mit Vortheil von verschiedenen Knochenfischen, wie *Gasterosteus*

Perca, Macropodus und einigen pelagischen, ferner von *Chironomus, Asellus,* Ascidien, *Planorbis,* vielen Cölenteraten etc. Ich rathe aber dem Forscher an, die beobachteten Stadien auch sorgfältig zu zeichnen, denn solche Zeichnungen gewähren beim Studium der Schnitte derselben Stadien eine sehr wichtige Hülfe.

Die Eier einiger Insekten und Arachniden, die sonst völlig undurchsichtig sind, werden in einem Tropfen Oel ganz durchsichtig, und sorgt man dafür, dass das Oel nur die Oberfläche imprägnirt und nicht tiefer eindringt, so geht die Entwicklung normal weiter (Balbiani).

578. Vorbereitung der Eier zum Schneiden. Kleine Embryonen fixirt Osmiumsäure allein oder mit anderen Reagentien zusammen sehr gut, nicht aber grosse. Sie bringt die Zellen etwas zum Schrumpfen und lässt so die Spalten zwischen den Keimblättern sehr klar hervortreten, ebenso Kanäle oder Hohlräume, die in der Bildung begriffen sind. Ferner hilft sie, da sie fettige Substanzen, also auch Myelin schwärzt, beim Studium der Entwicklung des Nervensystems.

Chromsäure ist für die Untersuchung der äusseren Gestalt der Embryonen unentbehrlich: sie lässt Erhöhungen und Vertiefungen klar hervortreten und erhält die gegenseitigen Beziehungen der Theile äusserst gut, dagegen durchaus nicht immer die Form der Zellen, bildet auch ein Hindernis für das Färben in toto.

Pikrinsäure und Gemische damit wirken entgegengesetzt wie Osmiumsäure: sie bringen die Zellen etwas zum Quellen nnd verdecken daher etwaige leere Räume in den Geweben. Trotzdem gehören sie, speziell die Pikrinschwefelsäure, nach Henneguy mit zu den besten Fixirmitteln für Embryonen (s. jedoch § 581 am Ende).

Rabl (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 165) empfiehlt für die Embryonen von Wirbelthieren (aber auch für andere Objekte) folgendes Gemisch: 1 Volumen 1 %ige Platinchloridlösung, 1 Vol. gesättigte Sublimatlösung und 2 Vol. destillirtes Wasser. Dies wendet er so, wie es da ist, für Keimscheiben und junge Embryonen aller Wirbelthierklassen an. Aeltere Embryonen von Teleostiern hingegen fixirt er in der heissen Flüssigkeit, um die Ruptur der Muskeln und das Schrumpfen der Chorda zu verhüten. Ferner empfiehlt Rabl sein Gemisch von Pikrinsäure und Sublimat (§ 63) besonders für etwas ältere Embryonen (z. B. *Gallus* vom 3.—4. Tage). Die Embryonen bleiben meist etwa 12 Stunden, jüngere kürzer, ältere bis zu 48 Stunden darin, werden einige Stunden in Wasser ausgewaschen und dann gradatim in

Alkohol gebracht (dieser ist alle Stunden etwas zu verstärken), sodass sie nach 24 Stunden in 80—90 %igem liegen; von da in absolutem.

Um eine Menge Eier von Echiniden gleichzeitig färben, einbetten und schneiden zu können, wickelt Boveri (Verh. Physik. Med. Ges. Würzburg 29. Bd. 1895 p. 4) sie in Fetzen der Epidermis von *Cryptobranchus* ein. Sobotta (Arch. Mikr. Anat. 50. Bd. 1897 p. 21) verwendet für die Eier von *Amphioxus* zu gleichem Zweck das Amnios von Säugethieren.

579. Rekonstruktion der Embryonen nach Schnitten. Das Studium von Schnittserien durch irgend ein hoch organisirtes Thier ist so komplizirt, dass man oft genug seine Zuflucht zu geometrischen oder plastischen Rekonstruktionen nehmen muss, um sich vom ganzen Thier eine Idee oder ein Modell zu verschaffen. Die Methoden hierzu sind gegenwärtig so vollkommen ausgearbeitet, dass ihre Beschreibung eher einen Band als einen Paragraphen nöthig machen würde. Hier sei daher nur verwiesen auf Born (Arch. Mikr. Anat. 22. Bd. 1883 p. 591; Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 433); Strasser (ibid. 3. Bd. 1886 p. 179; 4. Bd. 1887 p. 168, 330); Kastschenko (ibid. 4. Bd. 1887 p. 235, 353; 5. B. 1888 p. 173); Schaper (ibid. 13. Bd. 1897 p. 446).

Eine einfache, aber oft ganz ausreichende Methode beschreibt Fol (Lehrbuch p. 85), wie folgt. Vor dem Schneiden zeichne man sich die Umrisse des Embryos bei der Vergrösserung, die man für die Rekonstruktion brauchen will. in einer Ebene, die senkrecht auf den Schnitten steht; will man z. B. Querschnitte machen, so zeichnet man das Profil davon, also die Umrisse eines optischen Sagittalschnittes. Sämmtliche Schnitte zeichne man dann bei der nämlichen Vergrösserung. Nun ziehe man über die Profilzeichnung Linien, die den Querschnitten entsprechen, also quer zum Profil, parallel zu einander und in gleichen Abständen; sind z. B. die Schnitte $^1/_{100}$ mm dick und die Zeichnungen 100 mal vergrössert, so müssen die Linien um je 1 mm von einander entfernt sein (natürlich nur, falls alle Schnitte zur Rekonstruktion dienen sollen, aber man kommt auch oft mit jedem 5. oder 10. Schnitte rascher zu Stande).

Nun soll die Profilzeichnung mit den Einzelheiten aus den Querschnitten ausgefüllt werden. Da kann man sich gut folgendermassen helfen. Eine Glasplatte von der erforderlichen Grösse wird mit Gelatine überzogen und getrocknet. Darauf zieht man ganz dicht bei einander parallele Linien, aber in verschiedenen Farben, und zwar in regelmässiger Abwechselung. Zuletzt schneidet man die Platte mit dem Diamanten quer zu diesen Linien in 2 ungleich grosse Stücke. Das eine Stück legt man auf die Profilzeichnung, sodass die Schnittlinie des Glases die Linie bedeckt, die der Zeichnung des 1. Querschnittes entspricht; das andere Stück legt man auf diese Zeichnung so, dass die Grenzen der Zeichnung denselben farbigen Linien entsprechen, mit denen das andere Stück Glas auf den Grenzen der Profilzeichnung liegt. Alsdann lassen sich auf der Profilzeichnung leicht mit Punkten die Stellen der Umrisse

der Organe bezeichnen. So verfährt man mit allen Querschnitten und braucht dann nur noch die Punkte mit einander zu verbinden, um in der Profilzeichnung alle inneren Organe auf eine Ebene bezogen zu haben.

Die ganze Methode sieht sehr komplizirt aus, aber 5 Minuten Uebung mit einem Stück Pauspapier genügen, um sie in Wirklichkeit sehr einfach zu finden.

Eine andere einfache Methode besteht darin, dass man die Zeichnungen der Schnitte auf Pappe klebt, deren Dicke der Dicke der Schnitte und der Vergrösserung entspricht, alle Höhlungen im Schnitte mit einem Messer oder einer Laubsäge ausschneidet und zum Schlusse alle Pappstücke zusammenleimt. Dies giebt natürlich ein Modell.

Für einfache Fälle mag man auch nach Schaffer (Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 342) die Schnitte auf Pauspapier zeichnen, sie richtig übereinander schichten und gegen das Licht halten, um den Verlauf der Organe durch alle Papiere hindurch zu verfolgen. S. ferner Woodworth (Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 15: graphische Rekonstruktion aus Serien von Querschnitten) sowie die Methode von Eycleshymer zur Orientirung von Celloidinblöcken (§ 158) und die für Paraffinblöcke (§ 136).

Säugethiere.

580. Kaninchen. Herausnahme der Embryonen oder Eier. Die jungen Eier sucht man in den Tuben. Die Follikel platzen etwa 10 Stunden nach der 1. Begattung. Hat man die Tuben und den Uterus herausgeschnitten, so lässt man sie kalt werden und wartet, bis die Kontraktionen aufgehört haben. Dann präparirt man mit Scheere oder Messer die Peritonealhülle sorgfältig ab, legt die Tuben (die Eier sind noch bis zum Ende des 3. Tages nach der Begattung darin) auf ein langes Stück Glas und schneidet sie mit einer feinen scharfen Scheere ganz auf. Mit Nadeln und Pincette breitet man ihre Mucosa sorgfältigst aus und durchsucht sie mit einer Lupe oder unter dem Mikroskop mit einer schwachen Linse ordentlich. Hat man ein Ei gefunden, so giebt man einen Tropfen einer „indifferenten“ Flüssigkeit darauf und nimmt es dann mit der Spitze des Messers, einer Haarnadel oder einer kleinen Pipette fort. Man untersucht es lebendig in der Peritonealflüssigkeit der Mutter, wenn diese getödtet worden ist, oder in ihrem Humor aqueus oder in Amnioswasser etc. (§ 387 ff.). Findet man aber die Eier nicht gleich, so schabt man das Epithel der Mucosa mit einem kleinen Messer ab, mischt es mit etwas

indifferenter Flüssigkeit und sucht darin die Eier unter dem Mikroskop bei durchfallendem Lichte.

Kölliker injizirt mit einer feinen Spritze Müllers Gemisch oder schwache Osmiumsäure in den Ovidukt und fängt die auslaufende Flüssigkeit in Uhrgläsern auf, worin sich dann die Eier unter dem Mikroskop leicht finden lassen.

Ein und dasselbe Kaninchen kann auch für zwei Operationen dienen. Man macht in die Bauchhaut einen Schnitt von 8—10 cm Länge; ein Assistent hält die Eingeweide zurück; man legt eine Ligatur um die Basis des einen Uterushornes und eine andere um das Mesometrium und Mesovarium, trennt dann Ovarium, Tube und Horn dieser Seite mit einer Scheere ab und schliesst die Haut mit einigen Nähten. Die Thiere vertragen diese Operation ganz gut, und die Eier in der anderen Tube entwickeln sich ruhig weiter. Will man auch diese haben, so macht man entweder die zweite Laparotomie oder tödtet das Thier.

Während des 4.—6. Tages nach der Begattung sind die Eier noch frei in den Uterushörnern, mit blossem Auge sichtbar und in der nämlichen Weise wie früher aus den Tuben leicht zu erhalten. Nach dem 6. Tage treiben sie die Wand der Hörner da, wo sie liegen. etwa erbsengross vor, und dann zerschneidet man am besten die Hörner in so viel Stücke, wie Hervorragungen da sind, sorgt aber dafür, dass die Eier in der Mitte der Stücke liegen. Die Stücke befestigt man in einer Secirschale mit Nadeln so, dass die Wölbungen nach oben schauen, füllt die Schale mit Serum oder Müllers Gemisch, 1 $^0/_0$ iger Osmiumsäure, Pikrinschwefelsäure, Salpetersäure oder Lösung von Uraniumacetat. Nun schneidet man mit einem Messer die Wand der Wölbungen bis auf die Muskelschicht an, zerzupft die Mucosa mit einem Paar feiner Pincetten und macht so das Ei frei.

Sobald die Eier sich im Uterus festgesetzt haben, kann man sie natürlich nicht mehr ganz herausschälen. Da der Embryo immer an der mesometralen Seite des Uterus liegt, so öffnet man die Wölbung durch einen Kreuzschnitt und befestigt den Streifen der Mucosa. woran der Embryo sitzt, mit Nadeln in der Secirschale. E. van Beneden (Arch. Biol. Tome 5 1885 p. 378) hat diese Operation unter Serum von Kronecker (§ 390) ausgeführt und, indem er die Schale warm (bei Bluttemperatur) hielt, die Circulation im Embryo Stunden lang verfolgt. Will man dies thun, so darf man den Kreuzschnitt nicht zu weit führen, um den Sinus terminalis nicht zu verletzen.

Retterer (C. R. Soc. Biol. Paris (8) Tome 4 1887 p. 99) räth an, bei Eiern vom 7. Tage die Stücke des Uterus von der Mesometral-

seite her zu öffnen, weil das Ei sich an diese Seite noch nicht angeheftet hat. Er lässt dann mit einer Pipette Pikrinschwefelsäure zwischen Ei und freie Fläche des Uterus fliessen und erhält so das Ei als geschlossene Blase.

581. Dauerpräparate vom Kaninchen nach van Beneden (Arch. Biol. Tome 1 1880 p. 149). Das lebende Ei bringt man auf den Objektträger in einen Tropfen 1 %iger Osmiumsäure und von da in Müllers Gemisch (oder Pikrinschwefelsäure oder Ammoniumbichromat). Nach einer Stunde wechselt man die Flüssigkeit und legt nun den Objektträger auf 2—3 Tage in eine feuchte Kammer. Dann giebt man allmählich immer stärkeres Glycerin zu und bringt das Ei zuletzt in reines, mit etwas Osmiumsäure versetztes Glycerin. Auch kann man es, nachdem man es aus der Osmiumsäure herausgenommen und gut gewaschen hat, mit Bealeschem Karmin oder Pikrokarmin färben.

Um die Grenzen der Blastodermzellen gut zu sehen, bringt man das lebende Ei in eine 1/3 %ige Lösung von Höllenstein auf 1/2—2 Minuten (je nach dem Alter), dann in Wasser und setzt es dem Lichte aus; solche Präparate sind sehr instruktiv, aber nicht haltbar, da sie rasch zu dunkel werden.

Nach dem Ende des dritten Tages kann man die Keimblase mit feinen Nadeln öffnen, das Blastoderm waschen, färben und in Glycerin oder Balsam bringen; auch gute Vergoldungen hat van Beneden erzielt.

Kölliker empfiehlt für Keimscheiben und ältere Embryonen, das Ei auf etwa eine Stunde in eine 1/2 %ige Osmiumsäure zu legen, bis es ziemlich dunkel geworden ist, und es dann mit immer stärkerem Alkohol einige Stunden lang zu behandeln. Ist es bereits an der Uteruswand befestigt, so fixirt man diese, mit Nadeln ausgespannt, in 1/10 %iger Osmiumsäure 4—6 Stunden lang. Dann lässt sich die Keimblase leicht ablösen und, wie eben gemeldet, weiter behandeln. Um Schnitte zu erhalten, fixirt Kölliker mit Osmiumsäure, van Beneden hingegen 24 Stunden lang mit Chromsäure (dann sorgfältig auswaschen und in immer stärkeren Alkohol überführen). Diese härtet nämlich die Keimblase gut und belässt zugleich die Epiblastzellen völlig in Kontakt mit der Zona pellucida. Auch Pikrinschwefelsäure empfiehlt van Beneden, und Henneguy schreibt mir, er wende sie oft für Keimscheiben und ältere Embryonen an, stets mit ausgezeichnetem Erfolge. Auch Fols Modifikation von Flemmings Gemisch, ferner Osmiumsäure

und Alkohol nach Ranvier und Vignal (s. oben p. 26) seien vorzüglich. Zum Färben in toto empfiehlt Henneguy für kleine Embryonen Boraxkarmin oder Delafields Hämatoxylingemisch, für grosse ausschliesslich sein saures Alaunkarmin. Ich meine aber, man sollte Karmalaun nehmen. Einbettung in Paraffin.

Piersol (Zeit. Wiss. Z. 47. Bd. 1888 p. 155) verwendet entweder Pikrinschwefelsäure oder für junge Stadien 3 %ige Salpetersäure nach Altmann. Man vergleiche auch Weysse (Proc. Amer. Acad. Arts Sc. Vol. 30 1884 p. 285) über die Keimblase von *Sus scrofa;* Sobotta (Arch. Mikr. Anat. 45. Bd. 1895 p. 22) über Befruchtung und Furchung von *Mus musculus* (Fixirung am besten in schwachem Gemisch von Flemming 24 Stunden lang, Färbung der Paraffinschnitte mit Eisenhämatoxylin nach Benda; Pikrinschwefelsäure taugt nicht); Sobotta (Anat. Hefte 1. Abth. 8. Bd. 1897 p. 476) über die Corpora lutea von *Lepus cuniculus* (Fixirung mit Flemmings Gemisch oder Pikrinsublimat + 2 % Eisessig) und Bonnet (ibid. 9. Bd. 1897 p. 426) über die Embryonen von *Canis* (fixirt besonders in Sublimatsalzlösung).

Vögel.

582. Beobachtung am lebenden Objekte. Ausgezeichnete Anleitung hierzu geben die Grundzüge der Entwickelungsgeschichte der Thiere von Foster & Balfour (deutsch von Kleinenberg Leipzig 1876) p. 238—262. Hier seien nur einige neuere Daten nachgetragen.

Will man einen lebenden Embryo bei durchfallendem Lichte studiren, so öffne man das Ei unter Salzwasser (s. unten), entferne ein wenig Eiweiss durch das Fenster, nehme das Ei aus der Lösung heraus und lege einen Ring von gummirtem Papier so auf den Dotter, dass er den Keimhof umgiebt. Sobald (nach wenigen Minuten) das Papier an der Dotterhaut haftet, schneide man das Blastoderm nach aussen vom Papier rings durch, bringe das Ei in das Salzwasser zurück, nehme den Ring mit dem Blastoderm heraus und bringe ihn in einem Uhrglase oder auf einem Objektträger unter das Mikroskop (Duval).

583. Fenster nach Gerlach. Mit einer Scheere nehme man vom schmalen Ende des Eies die Schale fort, sauge mit einer Pipette ein wenig Eiweiss aus, gebe es aber, sobald sich das Blastoderm unter die Oeffnung geschoben hat, wieder zurück ins Ei. Nun bestreiche man die Ränder der Oeffnung (des „Fensters") mit Gummischleim, baue einen niedrigen Wall von Watte darum, lege hierauf ein kleines Uhrglas oder rundes Deckglas und kitte es mit Gummi fest; ist das Gummi trocken, so streiche man noch Kollodium

und Bernsteinfirniss darüber und bringe endlich das Ei in den Brütofen zurück. Durch dies Fenster kann man die Entwicklung bis zum 5. Tage verfolgen.

Genaueres hierüber s. im Anat. Anzeiger 2. Jahrg. 1887 p. 583 und 609.

584. Präparation der Embryonen. Während des ersten Brüttages lässt sich das Blastoderm nur sehr schwer vom Dotter abheben und wird daher besser mit ihm zusammen fixirt oder gehärtet. Später jedoch geht es leicht los, und man unterlasse es daher ja nicht, es zu entfernen. Um das Ei zu öffnen, lege man es hin, schlage mit raschem Hiebe die Schale am breiten Ende auf und nehme sie von dort aus vorsichtig in kleinen Stücken mit einer Pincette weg, bis das Blastoderm freiliegt. Dies muss unter Salzwasser (von 0,75 $^0/_0$) geschehen, dann aber hebe man das Ei ein wenig heraus, sodass das Blastoderm nicht mehr davon bespült wird, und tropfe auf dieses mit einer Pipette ein Fixirgemisch (1 $^0/_0$ ige Osmiumsäure, Gemisch von Ranvier und Vignal, Jodserum, Pikrinschwefelsäure, 10 $^0/_0$ ige Salpetersäure etc.). Indem man das obere Ende der Pipette geschlossen, das untere aber in Kontakt mit der Flüssigkeit auf dem Blastoderm hält, kann man dieses ganz leicht einige Minuten unter der Flüssigkeit halten, und dann wird es hart genug sein, um herausgeschnitten zu werden. (Natürlich kann man auch das Ei direkt in der Fixirflüssigkeit, z. B. 10 $^0/_0$ iger Salpetersäure, öffnen und das Blastoderm sich in 15—20 Minuten fixiren lassen, indessen meine ich, das obige Verfahren ist im Allgemeinen besser.)

Nun legt man das Ei wieder in das Salzwasser zurück, schneidet rund um den Keimhof herum, löst das Blastoderm los und schwemmt es in ein Uhrglas hinein, um es entweder unter dem Mikroskop zu studiren oder es in ein Härtgemisch zu bringen; bevor man jedoch letzteres thut, sollte man mit einer Pincette unter Schütteln die Dotterhaut vom Blastoderm entfernen. Das Fixiren mit 10 $^0/_0$ iger Salpetersäure erleichtert die Ablösung des Blastoderms sehr; man lässt sie 10 Minuten lang wirken und ersetzt sie vorsichtig durch 2 $^0/_0$ ige Lösung von Alaun (Hoffmann in: Arch. Mikr. Anat. 41. Bd. 1893 p. 46).

Damit sich die Ränder des Blastoderms beim Härten nicht nach oben schlagen, was sie gern thun, breitet man es am besten auf der konvexen Fläche eines Uhrglases aus und belässt es so während der Härtung.

Foster & Balfour empfehlen zum Härten Pikrinschwefelsäure (5 Stunden lang) und lassen dann direkt Alkohol folgen; oder $^1/_{10}$ $^0/_0$ ige Chrom-

säure (24 Stunden), dann $^{3}/_{10}$ %ige (24 Stunden), 70 %igen Alkohol (ebenso lange), 90 %igen (2 Tage), endlich absoluten; oder $^{1}/_{2}$ %ige Osmiumsäure ($2^{1}/_{2}$ Stunden im Dunkeln), Wasser, absoluten Alkohol. Henneguy greift lieber zum Gemisch von Ranvier und Vignal (oben p. 26) oder von Flemming.

Färben und Schneiden wie gewöhnlich. Embryonen bis zum Alter von 5 Stunden kann man auch ganz in Glycerin oder Balsam einschliessen.

585. Methode von Duval zur Orientirung (Ann. Sc. N. (6) Tome 18 1884 Art. No. 1 p. 3). Die frühesten Stadien vor dem Auftreten des Keimstreifs lassen sich nicht leicht orientiren, um Schnitte in einer bestimmten Richtung machen zu können. Duval nun geht von der Beobachtung aus, dass der Embryo fast stets auf dem Dotter so liegt, dass er das breite Ende zur linken, das schmale zur rechten Seite hat, und bezeichnet daher die Lage des Blastoderms auf folgende Weise. Einen Streifen Papier von 5 mm Breite und 50 mm Länge faltet er zweimal so um, dass ein dreieckiger Trog ohne Boden zu Stande kommt. Diesen setzt er auf den Dotter so auf, dass die Basis des Dreiecks dem Vorderende des Embryos entspricht, die Spitze dem Hinterende; liegt also das Ei mit dem breiten Ende links vor dem Operator, so ist die Spitze des Dreiecks gegen ihn gerichtet. Nun füllt er den Trog durch eine Pipette mit $^{3}/_{10}$ %iger Osmiumsäure und legt, sobald das Blastoderm dunkel wird, das ganze Ei in schwache Chromsäure, entfernt das Eiweiss und bringt das übrige Ei auf einige Tage in frische Chromsäure. Nach der Härtung zeigt sich dann auf dem Dotter ein schwarzes Dreieck um die Keimscheibe und giebt deren Lage an; dieses schneidet man mit Messer und Scheere aus und härtet es völlig in Chromsäure und Alkohol.

Man sehe auch die Kritik und Methode von Hirota (Journ. Coll. Sc. Japan Vol. 6 1894 p. 367; Journ. R. Micr. Soc. London 1895 p. 118) zur Untersuchung der Embryonalhäute von *Gallus*.

586. Methode von Kionka (Anat. Hefte 1. Abth. 3. Bd. 1894 p. 414; Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 250). Kionka öffnet zum Studium der Furchung die Eier unter 0,6 %igem Salzwasser, befreit sie von Schale und Eiweiss und bezeichnet die Pole, indem er etwa 1 cm weit von der Keimscheibe Igelstacheln einsticht, von denen der am stumpfen Pole einen rothen Faden trägt. Dann legt er sie vorsichtig in Wasser von 90° C. auf Watte, bringt sie nach 10 Minuten in 70 %igen

Alkohol und schneidet 24—36 Stunden später die Keimscheibe nebst etwas Dotter als gleichschenkeliges Dreieck heraus, dessen Basis das vordere Ende der Keimscheibe anzeigt. Einbettung durch Cedernöl in Paraffin, Färbung mit Boraxkarmin, Entfärbung mit saurem ($^1/_4$ %) Alkohol, dem auf je 5 ccm ein Tropfen konzentr. wässeriger Lösung von Orange G zugesetzt ist, um den Dotter zu färben.

587. **Methode von Vialleton** (Anat. Anzeiger 7. Jahrg. 1892 p. 624). Das Ei wird unter Salzwasser geöffnet, das Blastoderm herausgeschnitten, auf eine Glasplatte gebracht, mit 1%iger Lösung von Höllenstein behandelt, mit Wasser gewaschen und auf 6—12 Stunden in 70%igem Alkohol ins Dunkle gestellt. Färben in Boraxkarmin, Einschliessen in Dammar.

Böhm & Oppel (Taschenbuch 3. Aufl. 1896 p. 180) fixiren die Eier mit mittelgrossen Embryonen in einem Gemisch von 20 Theilen 3—5%iger Salpetersäure und 1—2 Theilen einer 1%igen Lösung von Höllenstein.

Reptilien.

588. Allgemeine Winke. Die oben für die Vögel angegebenen Methoden sind auch auf die Reptilien anwendbar, soweit sie Eier legen. Die frühesten Stadien fixirt man in situ auf dem Dotter; ältere Embryonen kann man für sich fixiren.

589. Spezielle Fälle. Mitsukuri (Journ. Coll. Sc. Japan Vol. 6 1894 p. 229) konservirt die Embryonen von Schildkröten hauptsächlich mit Pikrinschwefelsäure, und zwar je nach dem Alter in verschiedener Weise: handelt es sich noch um das Blastoderm, so nimmt er die ganze Schale und vom Eiweiss möglichst viel fort, bezeichnet die Stelle, wo das Blastoderm liegt, mit einem Haar, bringt das Ei mit dem Blastoderm nach oben in die Säure und schneidet letzteres nach einigen Stunden heraus, um es noch länger für sich zu härten. Junge Embryonen haften gewöhnlich der Schale an, können also mit dem betreffenden Stück von ihr wie in einem Uhrglase fixirt werden und werden nach $^1/_2$ Stunde von der Schale abgelöst und weiter gehärtet. Sind aber schon die Embryonalhüllen vorhanden, so wird die Schale an einer Stelle abgeschabt und mit Pikrinschwefelsäure behandelt, bis ein kleines Loch entsteht; von hier aus fährt man mit Schaben und Auftröpfeln von Säure fort, bis sich ohne Verletzung der Hüllen die ganze Schale entfernen lässt.

Will (Z. Jahrb. Abth. Morph. 6. Bd. 1892 p. 8) öffnet die Eier von *Platydactylus* in dem Fixirgemisch (besonders Chromsäure oder Chromosmiumessigsäure, die aber nur wenig Osmiumsäure enthält)

und härtet die Embryonen sammt dem Dotter. — Die Embryonen von *Cistudo* und von *Lacerta* behandelt er (1893 u. 1895) ebenso. Mehnert (Anat. Anzeiger 11. Bd. 1895 p. 257) ist mit Wills Methoden nicht einverstanden; seine eigenen sind beschrieben in: Morph. Arb. Schwalbe 1. Bd. 1891 p. 370.

Strahl (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. f. 1881 p. 123) verwendet für *Lacerta* Pikrinschwefelsäure.

Kupffer (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. f. 1882 p. 4) öffnet die dem Ovidukt entnommenen Eier von *Lacerta*, *Emys*, *Coluber* etc. unter Osmiumsäure (1:1000), entfernt das Eiweiss möglichst gut, bringt den Dotter auf 24 Stunden in Chromsäure (1:300), schneidet um das Blastoderm herum ein, hebt es heraus, wäscht es in Wasser, legt es auf 3 Stunden in Glycerin, Alkohol und Wasser zu gleichen Theilen, endlich in Alkohol von 90 %.

Böhm & Oppel (Taschenbuch 3. Aufl. 1896 p. 178) legen die Eier von *Lacerta* und *Anguis* auf 2—3 Stunden in „Sublimat-Eisessig (5 %)“, dann auf 8—24 Stunden in eine gesättigte wässerige Lösung von Pikrinsäure, lösen darauf unter Wasser die Schale ab und bringen die Eier oder nur die Embryonen direkt in 70 %igen Alkohol.

Amphibien.

590. Allgemeines. Um die Eier zum Schneiden zu präpariren, muss man zunächst die dicke Gallerte entfernen. Dies lässt sich durch Einlegen der Eier auf 2—3 Tage in 1 %ige Chromsäure und häufiges Schütteln erreichen, aber die Eier werden dabei sehr brüchig. Whitman (Amer. Natural. Vol. 22 1888 p. 857) bringt dagegen die vorher fixirten Eier in eine 10 %ige Lösung von Natriumhypochlorit, die mit dem 5—6 fachen an Wasser verdünnt ist, auf so lange, bis man sie durch Schütteln frei machen kann, was z. B. bei *Necturus* in einigen Minuten der Fall ist. Blochmann (Z. Anzeiger 12. Jahrg. 1889 p. 269) legt die mit Flemmings Gemisch fixirten Eier auf 15—30 Minuten in verdünnte Eau de Javelle (1 Theil und 3—4 Theile Wasser) und bewegt sie darin. (Nachher kommen sie wie gewöhnlich in Alkohol.) Einige andere Methoden sind in den nächsten §§ angegeben. S. ferner oben § 62.

Carnoy & Lebrun (La Cellule Tome 12 1897 p. 212) fixiren das Keimbläschen der Batrachier entweder, indem sie die Eier auf dem Objektträger zerdrücken und es dann den Dämpfen von Osmiumsäure oder schwefliger Säure aussetzen, oder indem sie die mit der Scheere

angeschnittenen Eierstöcke auf $^1/_4$—1 Stunde in das Sublimatgemisch von Gilson (oben § 62) legen, 1 Stunde auswaschen und allmählich in 80 $^0/_0$igen Alkohol bringen. Beim Einbetten in Paraffin verfahren sie, um den Dotter nicht brüchig zu machen, vorsichtig: sie bringen die Eier aus dem 80 $^0/_0$igen auf $^1/_4$ Stunde in 95 $^0/_0$igen, auf 5 Minuten in absoluten Alkohol, dann in ein Gemisch von Alkohol und Chloroform zu gleichen Theilen, und sobald sie darin untergesunken sind, in reines Chloroform, dem sie bereits nach 3—15 Minuten das gleiche Volumen Paraffin hinzufügen; nun zum Schmelzen des Paraffins in den Thermostaten bei 35—36 ° C. und nach 2$^1/_2$—3 Stunden auf höchstens 5 Minuten in Paraffin, das bei 52 ° C. geschmolzen ist. Die Schnitte färben sie mit ihrem Hämateïngemisch (ähnlich dem von Delafield, nur stärker) $^1/_2$—2 Minuten lang und schliessen sie durch Cajeputöl in Kolophonium ein. Ueberfärbung korrigiren sie mit Jodwasser. Die ganzen Eier färben sie mit dem stark verdünnten Hämateïngemisch 24 Stunden lang. Doppelfärbungen mit Indigkarmin oder mit Congoroth (§ 308) etc.

591. Siredon. Die Eier sind leicht zu präpariren, da zwischen Ei und Hülle ein weiter Raum voll einer nicht koagulirenden Flüssigkeit liegt. Man bringt sie daher auf einige Stunden in Pikrinschwefelsäure, sticht das innere Chorion mit einer feinen Nadel oder Scheere an und presst das Ei sanft hervor. Härtung in Alkohol. S. auch § 594.

592. Triton. Scott & Osborn (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 19 1879 p. 449) schneiden die sehr zarten Gallertschichten um das Ei eine nach der andern mit der Scheere durch, holen das Ei hervor und fixiren es mit Pikrinschwefelsäure als dem besten Mittel dafür. O. Hertwig (Jena. Zeit. Naturw. 15. Bd. 1881 p. 291) legt die Eier in ein Gemisch von „2 $^0/_0$ Essigsäure und 0,5 $^0/_0$ Chromsäure", schneidet 10 Stunden später die Hüllen durch, öffnet das innere Chorion an einem Ende, holt die Embryonen heraus und bringt sie in Alkohol von 70—90 $^0/_0$. Siehe auch § 594.

Braus (Jena. Zeit. Naturw. 29. Bd. 1894 p. 443) entfernt von den Eiern die Gallerte, indem er diese mit einer Insektennadel durchsticht, das Ei auf einem Stück Leber feststeckt und nun mit einem Rasirmesser die Gallerte so durchschneidet, dass das Ei hervortritt und direkt in das Fixirgemisch (Sublimatessigsäure nach Drüner, oben § 61) gelegt werden kann. Färbung der Schnitte mit Biondischem Gemisch nach Drüner (oben p. 193).

Michaelis (Arch. Mikr. Anat. 48. Bd. 1896 p. 528) fixirt die Eier sammt den Hüllen in einem Gemisch von konzentrirter Sublimatlösung und konzentrirter Pikrinsäurelösung je 20, Eisessig 1 und Wasser 40 Theilen, präparirt aber vor dem Einlegen in Alkohol die Hüllen ab. Färbung der Paraffinschnitte mit Eisenhämatoxylin.

593. Salamandra. S. Rabl (Morph. Jahrb. 12. Bd. 1886 p. 252); seine neueren Methoden s. § 578.

594. Anuren. O. Hertwig (Jena. Zeit. Naturw. 16. Bd. 1883 p. 249) bringt die Eier auf 5—10 Minuten in Wasser von 90—96° C., schneidet dann die Hüllen durch, holt die Eier heraus und härtet sie entweder in ½ %iger Chromsäure (höchstens 12 Stunden lang) oder in Alkohol von 70, 80 und 90 %. Morgan (Amer. Natural. Vol. 25 1891 p. 759) schneidet die Eier einzeln aus dem Laich heraus, bringt sie auf 1 bis 12 Stunden in eine gesättigte Lösung von Pikrinsäure in 35 %igem Alkohol, der mit 2 % Schwefelsäure versetzt ist, und von da in 35—70 %igen Alkohol. Darin schwillt die innere Hülle so an, dass man sie nach 3—4 Tagen anstechen und das Ei herausholen kann, das man nun in 80 %igen Alkohol legt. — S. ferner Whitman, Methods p. 156, und O. Schultze in: Zeit. Wiss. Z. 45. Bd. 1887 p. 185 (Eier von *Triton*, *Siredon*, *Rana* und *Bufo* 24 Stunden mit Flemmings Gemisch, gut ausgewaschen, dann Alkohol von 50—95 %).

Morgan (Development of the Frogg's Egg. New York 1897 p. 171) bringt die Eier nur auf 2—5 Stunden in absoluten Alkohol, dann auf 2—3 Stunden in Terpentinöl, von da auf je ½ Stunde in weiches und hartes (von 56—58° Schmelzpunkt) Paraffin und schneidet sie bei 24—26° C. (das Mikrotom stellt man eventuell in die Sonne); der Dotter ist dann nicht brüchig.

595. Härten mit Kupfersulfat. Fol giebt (Lehrb. p. 106) folgendes Gemisch (nach Remak und Götte) für Amphibieneier an: je 50 ccm einer 2 %igen Lösung von Kupfersulfat und von 25 %igem Alkohol, dazu 35 Tropfen rektifizirten Holzessig.

Fische.

596. Knochenfische. Die Eier mancher Knochenfische lassen sich lebendig bei durchfallendem Lichte beobachten, die der Salmoniden hingegen muss man härten und aus ihren Hüllen herausschälen, um die Entwicklung ihrer Form zu studiren. Man legt sie also auf einige Minuten in 1—2 %ige Essigsäure, dann in 1 %ige Chromsäure, öffnet nach 3 Tagen die Kapsel an dem dem Embryo entgegengesetzten

Ende und nimmt sie mit einer feinen Pincette fort. Darauf wäscht man das Ei 1 Tag lang mit destillirtem Wasser und härtet es in immer stärkerem Alkohol. Die Embryonen sind makro- und mikroskopisch recht gut erhalten, nur der Dotter wird rasch äusserst hart und so brüchig, dass er dem Schneiden grosse Hindernisse in den Weg legt. Dagegen lassen sich die Eier gut schneiden, wenn man sie zunächst auf einige Minuten in 1 %ige Osmiumsäure, dann, sowie sie darin hellbraun geworden sind, in Müllers Gemisch bringt, sie hierin mit einer feinen Scheere öffnet und, da der Dotter weich bleibt, den Embryo sammt der Rindenschicht aus der Kapsel herausholt, um ihn auf einige Tage in reines Müllersches Gemisch zu legen, dann einen Tag lang mit Wasser zu waschen und zum Schluss in Alkohol zu härten.

Henneguy fixirt die Eier in einem Gemisch von 10 Theilen Pikrinschwefelsäure und 1 Theil Essigsäure, öffnet sie 10 Minuten später unter 10 %iger Essigsäure, die den Dotter löst, bringt darauf die Embryonen in reine Pikrinschwefelsäure und von da in immer stärkeren Alkohol.

597. Fixirgemisch von Kollmann (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. f. 1885 p. 296) für Knochenfische. Man legt die Eier auf 12 Stunden in ein Gemisch von 5 Theilen Kaliumbichromat, 2 Theilen Chromsäure, 2 Theilen Salpetersäure und 100 Theilen Wasser, wäscht sie ebenso lange in Wasser, entfernt dann das Chorion und bringt die Eier direkt in 70%igen Alkohol.

598. Methode von Rabl für Hai- und Knochenfische (s. § 578).

599. Methode von M. Kowalewski (Zeit. Wiss. Z. 43. Bd. 1886 p. 434) für Knochenfische. Die Eier kommen auf 1 1/4 Stunde in ein Gemisch von 8 Vol. Pikrinschwefelsäure und 1 Vol. 1%ige Chromsäure, dann auf 12 Stunden in öfters gewechselten Alkohol von 20%, der in etwa 10 Stunden allmählich auf 70% verstärkt wird. Vor dem Färben muss das Chorion entfernt werden.

600. Methode von Harrison (Arch. Mikr. Anat. 46. Bd. 1895 p. 505). Konservirung der Embryonen von *Salmo* in einer gesättigten Lösung von Sublimat in 5%iger Essigsäure; Färbung mit dem Hämatoxylingemisch von Delafield und nachher mit Pikrinsäure. — Aehnlich Felix (Anat. Hefte 1. Abth. 8. Bd. 1897 p. 252): er fixirt die Eier mit Sublimat-Eisessig 3/4 Stunden lang, die abpräparirten Embryonen in Zenkers Gemisch (wobei er den Dotter aus der Bauchhöhle mit einem Pinsel entfernt). Färbung mit Boraxkarmin und Jodgrün (2%ige Lösung in 50%igem Alkohol). Erst kurz vor dem Einbetten kommen die Objekte in stärkeren als 80%igen Alkohol.

601. Methode von Rabl-Rückhard (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. f. 1882 p. 118). R. fixirt die Eier von Salmoniden 1/4 Stunde lang in 10%iger Salpetersäure, entfernt die Eihüllen, damit der Embryo nicht durch ihren Druck

leide, bringt die Eier in die Säure zurück, wäscht sie 1 Stunde später mehrere Stunden lang mit einer 1—2 %igen Alaunlösung und härtet sie in Alkohol. Goronowitsch (Morph. Jahrb. 10. Bd. 1884 p. 381) ändert für Totalansichten der Embryonen diese Methode dahin ab, dass er die Eier auf etwa 3 Minuten in 5 %ige Salpetersäure, dann auf 1 Stunde in 5 %ige Alaunlösung legt, sie dann halbirt, um den Dotter sich im Alaun auflösen zu lassen, und nun die Keimscheiben in 10 %iges Glycerin mit etwas Sublimat bringt. Für Schnitte hingegen verwendet er Pikrinschwefelsäure 3 Stunden lang, entfernt aber schon nach 10 Minuten das Chorion; später Alkohol von 40, 70, 90 %. Einbettung in Paraffin. S. auch im Nachtrag § 885.

602. Pelagische Fischeier. Whitman (Amer. Natural. Vol. 17 1883 p. 1204; Methods p. 152) legt die Eier auf 5—10 Minuten in ein Gemisch von 1/3 %iger Osmiumsäure und Seewasser zu gleichen Theilen, darauf in die Eisigsche Modifikation des Merkelschen Gemisches, nämlich in gleiche Theile von 1/4 %iger Platinchloridlösung und 1 %iger Chromsäure. Nach 1—2 Tagen sticht er die Eikapsel an und bringt nun das Ei in Alkohol. Vergl. auch Agassiz & Whitman (Proc. Amer. Acad. Vol. 20 1884 p. 28).

Collinge (Ann. Mag. N. H. (6) Vol. 10 1892 p. 228) tödtet die Eier von marinen Teleostiern durch Zusatz von etwas gesättigter Pikrinsäurelösung, die mit 5 % Salzsäure vermischt ist, zum Seewasser (zu 30 ccm 3 oder 4 Tropfen), lässt sie hierin höchstens 3 Minuten unter Umrühren, wäscht sie gut in Wasser und härtet sie in einem Gemisch von Kampherspiritus 1 Theil, 2 %iger Essigsäure und Alkohol je 4 Theilen. (Collinge giebt noch mehrere andere Gemische an, empfiehlt aber selbst das obige als das beste.)

Raffaele (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1895 p. 169) fixirt die Eier hauptsächlich mit dem Gemisch von Hermann (1—3 Tage lang) oder von Mingazzini (absolutem Alkohol und Eisessig je 1 Theil, konzentrirter wässeriger Lösung von Sublimat 2 Theilen).

602a. Amphioxus. Nach Sobotta (Arch. Mikr. Anat. 50. Bd. 1897 p. 20) werden die Eier am besten in Flemmings Gemisch 24 Stunden lang fixirt. Ueber Färben etc. s. § 578 am Ende.

Tunikaten.

603. Eier. Davidoff (Mitth. Z. Stat. Neapel 9. Bd. 1889 p. 118) fixirt die Eier von *Distaplia* in einem Gemisch von 3 Theilen konzentr. wässeriger Sublimatlösung und 1 Theil Eisessig 1/2—1 Stunde lang, wäscht sie dann einige Minuten mit Wasser und bringt sie in immer stärkeren Alkohol. Beinahe so gut wirkt auch ein Gemisch von 3 Theilen gesättigter wässeriger Lösung von Pikrinsäure und 1 Theil Eisessig; hierin bleiben die Eier 3—4 Stunden und kommen dann direkt in 70 %igen Alkohol.

Morgan (Journ. Morph. Boston Vol. 4 1891 p. 195) zerzupft die Ovarien von Ascidien in schwacher Osmiumsäure, wäscht sie mit destillirtem Wasser, behandelt sie $^{1}/_{2}$ Stunde lang mit einer $1\,^{0}/_{0}$igen Lösung von Höllenstein, ferner ebenso lange mit $2\,^{0}/_{0}$iger Essigsäure und reduzirt am Licht. Hierdurch treten die Grenzen der Follikelzellen klar hervor.

Castle (Bull. Mus. Harvard Coll. Vol. 27 1896 p. 213) empfiehlt für die Eier von *Ciona* in erster Linie Perényis Gemisch (20 Minuten lang, dann Alkohol von $70\,^{0}/_{0}$ und nach 24 Stunden von $90\,^{0}/_{0}$), für die Larven Pikrinsalpetersäure. Zum Färben dient am besten Orths Pikrolithionkarmin (6—24 Stunden lang, dann Wasser); die gefärbten Eier werden nach Chabry zur Sprengung der Hüllen in eine Kapillare aufgesaugt, die gerade weit genug ist, um sie nackt durch zu lassen. Dann Einschluss in Balsam; eventuell wird dieser durch Xylol wieder entfernt und das in toto studirte Ei in einem mit Glycerin bestrichenen Uhrglas 15—20 Minuten lang mit flüssigem Paraffin behandelt. Nachfärbung der Schnitte mit Ehrlichs Hämatoxylingemisch.

604. Knospen. Pizon (Ann. Sc. N. (7) Tome 14 1893 p. 5) studirt die Knospung bei den zusammengesetzten Ascidien entweder an den ganzen Stöcken, die er vorher mit Wasserstoffhyperoxyd bleicht (dieses wirkt nicht so roh wie Eau de Javelle, man muss aber die Luftblasen mit der Luftpumpe entfernen) und dann färbt, oder auf Schnitten nach Betäubung der Kolonien mit Cocaïn (1:1000), Fixirung in Eisessig, Pikrinschwefelsäure oder Flemmingschem Gemisch und Färbung in toto mit Borax- (oder Alaun-)karmin und Methylenblau (sehr starke Lösung in Alkohol von 90 und $100\,^{0}/_{0}$) nach Bernard (ibid. Tome 9 1890 p. 97).

Ritter (Journ. Morph. Boston Vol. 12 1896 p. 150) empfiehlt zum Fixiren von *Perophora* und *Goodsiria* besonders Pikrinschwefelsäure.

Bryozoen.

605. Statoblasten. Braem (Bibl. Z. Chun & Leuckart 6. Heft 1890 p. 95) fixirt die Statoblasten von *Cristatella,* um die Entwickelung der Embryonen zu untersuchen, mit heisser konzentr. Lösung von Sublimat, bringt sie nach 10 Minuten in Wasser, schneidet sie mit dem Rasirmesser an und führt sie 1 Stunde später allmählich in Alkohol von $96\,^{0}/_{0}$ über. Färbung mit Pikrokarmin.

Mollusken.

606. Cephalopoden. Ussow (Arch. Biol. Tome 2 1881 p. 582) legt die Eier in Furchung, ohne die Hüllen zu entfernen, auf 2 Minuten in $2\,^{0}/_{0}$ige Chromsäure, dann ebenso lange in destill. Wasser mit einer Spur Essigsäure (1 Tropfen auf ein Uhrglas voll). Macht man nun

in die Hülle einen Schnitt, so fliesst der Dotter aus; sollte noch etwas davon am Blastoderm kleben, so ersetzt man das Wasser durch frisches.

Watasé (Journ. Morph. Boston Vol. 4 1891 p. 249) tödtet die Eier in dem Macerirgemisch von Hertwig (§ 530), löst das Blastoderm, sobald es undurchsichtig wird, los und bringt es in verdünntes Glycerin. Für Oberflächenbilder der Furchung empfiehlt er Perényis Gemisch.

Vialleton (Ann. Sc. N. (7) Tome 6 1887 p. 168) bringt die Eierstockseier von *Sepia* in ein frisches Gemisch gleicher Theile Pikrinschwefelsäure und $2\frac{1}{2}$ %iger Lösung von Kaliumbichromat, schneidet sie nach 1—2 Minuten im Aequator durch, fixirt die Hälfte, die den Bildungsdotter enthält, $1\frac{1}{2}$ Stunde lang in Pikrinschwefelsäure, hebt diesen mit einem Spatel vom Nahrungsdotter ab, breitet ihn flach aus und härtet ihn in Alkohol von 70—90 %. Ganze Eier fixirt er zum Schneiden in Flemmings Gemisch oder Osmiumsäure. In älteren Eiern lässt sich das Blastoderm direkt in Pikrinschwefelsäure vom Dotter loslösen.

Korschelt (Festschrift Leuckart Leipzig 1892 p. 348) konservirt die älteren Embryonen von *Loligo* in Flemmings Gemisch, Sublimat, Pikrinschwefelsäure oder $\frac{1}{5}$ %iger Chromsäure. Letztere ist für jüngere Embryonen besonders gut, wenn man sie hinterher durch Pikrinsäure, die oft gewechselt wird, auswäscht.

607. Gastropoden. Henneguy legt die Eier von *Helix* auf 4—6 Stunden in Pikrinsalpetersäure (s. oben § 79), löst so den Kalk in der äusseren Hülle auf und koagulirt die Eiweissschicht des Eies. Nun öffnet er das Ei mit Nadeln, nimmt das Eiweiss stückweise weg und legt so den Embryo frei. Darauf Alkohol etc. bis Paraffin.

Henchman (Bull. Mus. Harvard Coll. Vol. 20 1890 p. 172; Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 216) tödtet die Eier mit $\frac{1}{3}$ %iger Chromsäure oder mit Perényis Gemisch. Verwendet man jene, so entferne man vorher nur die äussere Hülle und erst einige Minuten später unter der Säure auch die innere; sonst jedoch muss man beide wegnehmen, denn in P.s Gemisch koagulirt das Eiweiss so stark, das man die Embryonen nicht frei machen kann.

Meisenheimer (Zeit. Wiss. Z. 62. Bd. 1896 p. 417) legt die Embryonen von *Limax* zunächst mit Nadel und Messer frei und fixirt sie dann mit Pikrinschwefelsäure oder konzentrirter Sublimatlösung. Aeltere Embryonen streckt er vorher durch 2 %ige Cocaïnlösung oder

direkt durch heisse Sublimatlösung. Einbettung in Paraffin (54—56° C.) durch Chloroform sehr vorsichtig, um Schrumpfungen zu vermeiden.

Kostanecki & Wierzejski (Arch. Mikr. Anat. 47. Bd. 1886 p. 313) konserviren den Laich von *Physa* entweder mit $1\frac{1}{2}$—2 %iger Salpetersäure oder in „Sublimat und 3 % Salpetersäure (im Verhältniss 2:1)“ und bringen ihn dann in Alkohol von 30—100 %. Den Laich betten sie in Paraffin, die isolirten Embryonen dagegen in Celloidin ein. Ueber die Färbung s. oben p. 152.

F. Schmidt (Entwicklungsgesch. Pulmonaten Dorpat 1891 p. 4) findet Chromsäure und Pikrinsäure für die Embryonen nicht gut und konservirt die ganzen Eier mit konzentr. Sublimat (10—15 Minuten), präparirt nach längerem Waschen mit destill. Wasser die Embryonen heraus und behandelt sie wie gewöhnlich weiter.

Washburn (Amer. Natural. Vol. 28 1894 p. 528) fixirt die abgelegten Eier von *Limax* 5 Minuten lang in Flemmings Chromessigsäure, entfernt unter Wasser die Hülle, legt darauf den Dotter wieder auf 5 Minuten in die Lösung, auf 10 Minuten in Wasser, dann in Alkohol von 35, 50, 70 und 90 %. Oder ähnliche Behandlung mit $\frac{1}{3}$ %iger Chromsäure, oder: auf 5 Minuten in 1 %ige Osmiumsäure, dann auf 4 Stunden in Merkels Gemisch, darauf die Hülle entfernt, das Ei in Wasser gewaschen und wie oben in Alkohol. Um jüngere Eier zu erhalten, schneidet W. ein ♀ auf, wirft es sofort auf 1 Minute in heisse Sublimatlösung, holt unter Wasser die Eier heraus und entfernt die Hülle, dann Alkohol von 35, 50 und 70 %.

Kofoid (Bull. Mus. Harvard Coll. Vol. 27 1895 p. 35) bedient sich der Methode von Schmidt; nämlich er legt die Eier in konzentr. wässerige Sublimatlösung, wäscht sie, sobald sie undurchsichtig geworden sind, mit Wasser, entfernt die Schale und (durch einen sanften Wasserstrom aus einer Pipette) auch das Eiweiss. Noch besser aber: man legt sie zunächst in Normalsalzwasser (0.75 %), entfernt die Schale und mit einer Pipette voll Salzwasser das Eiweiss, das sich in dem Wasser löst; jedoch muss man rasch verfahren, da das Wasser doch die Kerne etwas angreift. Nun kommen die Eier in das Fixirgemisch, am besten in Fols Modifikation von Flemmings Gemisch auf 1 Minute, darauf direkt in Orths Pikrolithionkarmin, 12 bis 24 Stunden später in sauren Alkohol (von 90 % mit 5 % Salzsäure).

Conklin (Journ. Morph. Boston Vol. 13 1897 p. 7) fixirt für Oberflächenbilder die Eier von *Crepidula* in Pikrinschwefelsäure 15—30 Minuten lang und färbt sie mit verdünntem, leicht mit Salzsäure angesäuertem Delafieldschem Hämateïngemisch. Auch für Paraffinschnitte ist Pikrinschwefelsäure im Allgemeinen gut; Färbung der Schnitte mit Delafields Gemisch und einer Lösung von Erythrosin in Anilinwasser.

608. Chiton. Metcalf (Stud. Biol. Lab. J. Hopkins Univ. Baltimore Vol. 5 1893 p. 251) empfiehlt zum Fixiren besonders eine wässerige Lösung von Pikrinsäure in Salzwasser vom spezif. Gewicht des Seewassers. Die Eier mit ganz jungen Embryonen legt er auf 20—45 Sekunden in Eau de Labarraque, dann in Wasser, worin das Chorion anschwillt und leicht entfernt werden kann; bleiben die Eier etwas länger in jener Lösung, so wird auch der Dotter aus den Zellen völlig aufgelöst, während Plasma und Kern ziemlich intakt bleiben.

609. Lamellibranchiaten. Stauffacher (Jena. Zeit. Naturw. 28. Bd. 1893 p. 196) fixirt die Embryonen von *Cyclas* in Sublimat, färbt sie mit Hämalaun und bettet sie in Paraffin ein. Lillie (Journ. Morph. Boston Vol. 10 1895 p. 7) bringt die Eier von *Unio* auf 10 bis 20 Minuten in Perényis Gemisch (§ 50), wäscht sie und hebt sie in Alkohol von 70 % auf. Nach 3—4 Monaten legt er sie ungefärbt in 50 %iges Glycerin und lässt dieses sich durch Verdunsten des Wassers langsam konzentriren; oder er legt die Eier direkt aus dem Fixirgemisch in 50 %iges Glycerin und färbt sie mit Schneiders Essigkarmin. Aeltere Embryonen fixirt er mit Merkels Gemisch oder mit Sublimat, Larven behandelt er mit Osmiumsäure ($^1/_{10}$—$^1/_{20}$ %) und legt sie dann in Glycerin ein. Die Glochidien lassen sich mit den Schalen in hartem Paraffin (58°) schneiden; vor dem Fixiren werden sie mit Chloralhydrat betäubt.

Arthropoden.

610. Fixiren der Eier. Meist lassen sich die Eier durch Hitze besser fixiren als sonst wie. Dann lässt man entweder Alkohol oder ein wässeriges Härtmittel folgen. Will man Hitze vermeiden, so nehme man Pikrinsalpetersäure.

611. Das **Chorion** zu entfernen, ist oft sehr schwer, und es mag daher häufig rathsam sein, es nicht zu entfernen, sondern nur durch Eau de Javelle oder Labarraque zu erweichen (s. § 569). Morgan (Amer. Natural. Vol. 22 1888 p. 357; Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 69) empfiehlt für *Periplaneta*, Eau de Labarraque, auf $^1/_5$—$^1/_8$ verdünnt und leicht erwärmt, $^1/_2$—1 Stunde auf die lebenden Eier einwirken zu lassen; die Kapseln werden dann weich genug. Mit schon fixirten Eiern geht dies nicht so rasch. Natürlich darf die Flüssigkeit nicht in das Ei eindringen.

612. Methode von Henking für Insekten (Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 156). Henking tödtet die Eier durch Eintauchen in heisses

Wasser oder Zugiessen von heissem Wasser zu ihnen und bringt sie dann in 70 %igen Alkohol, findet aber, wie zu erwarten war, die feineren Strukturen nicht besonders gut erhalten. In einigen Fällen giebt, wie ebenfalls klar ist, Flemmings Gemisch sehr viel bessere Resultate: man legt die Eier auf 1/2 Stunde hinein, dann auf 2 Stunden in das mit dem dreifachen Volumen verdünnte Gemisch, und behandelt sie zuletzt wie gebräuchlich mit Alkohol. Die Pikrinessigsäure von Boveri (§ 84) dringt nicht durch die Eihülle ein. Die Eau de Javelle vermeidet man lieber ganz und entfernt entweder die Hüllen mechanisch oder lässt sie um das Ei und schneidet sie mit, je nachdem es besser geht. Am meisten Schwierigkeiten macht beim Schneiden der Dotter, aber man kann sie wie folgt vermeiden: man fixirt das Ei, bringt es in Alkohol, dann in Boraxkarmin (man muss das Chorion anstechen, sonst dringt das Karmin nicht ein), daraus auf 12 Stunden in sauren Alkohol von 70 % (20 ccm mit 1 Tropfen Salzsäure und einer Messerspitze voll Pepsin), endlich durch Bergamottöl in Paraffin, worin sie sich (mit einigen Ausnahmen, z. B. *Bombyx mori*), ohne dass der Dotter krümelt, schneiden lassen. Um den Inhalt frischer Eier zu studiren, zerzupft Henking sie in folgendem Gemisch: Wasser 80 ccm, Glycerin 16, Ameisensäure 3, 1 %ige Osmiumsäure 1 ccm, Dahlia 0,04 g; solche Präparate lassen sich auch einfach durch Aufkitten des Deckglases permanent machen.

Speziell von den **Dipteren** fixirt Henking (Zeit. Wiss. Z. 46. Bd. 1888 p. 289) die Eier im Mutterleibe durch heisses Wasser, schneidet sie dann heraus und härtet sie in Alkohol von 70 %. Die abgelegten Eier fixirt er durch Uebergiessen mit heissem Wasser oder dadurch, dass er sie mit Flemmingschem Gemisch in ein Reagensglas bringt, das er auf etwa 1 Minute in heisses Wasser taucht, bis die Eier sich schwärzen. (Kaltes Gemisch ruft leicht Vacuolen in den Eiern hervor.) Er sticht die Eier dann am stumpfen Pole an, färbt sie mit Boraxkarmin 15—30 Stunden lang und bettet sie in Paraffin ein. — Ritter (Zeit. Wiss. Z. 50. Bd. 1890 p. 408) fixirt die Eischnüre von *Chironomus* mit heissem 30 %igem Alkohol, worin etwas Sublimat gelöst ist, und färbt sie mit Pikrokarmin.

Bruel (Z. Jahrb. Abth. Morph. 10. Bd. 1897 p. 569) benutzt zum Konserviren der Larven und Puppen heissen (70—75 ° C.) absol. Alkohol „mit etwas Sublimatzusatz“; aber der Alkohol müsse auch wirklich absolut sein, da schon 99 %iger oft empfindliche Schrumpfungen bewirke. S. auch van Rees (ibid. 3. Bd. 1888 p. 10) und unten § 894.

613. Lepidopteren. Bobretzky (Zeit. Wiss. Z. 31. Bd. 1878 p. 198) erwärmt die Eier ein wenig in Wasser, bringt sie auf 16—20 Stunden

in $^1/_2$ %ige Chromsäure, entfernt dann das Chorion, legt sie auf einige Stunden in absoluten Alkohol, färbt sie mit Karmin und schneidet sie.

614. Blattiden. Patten (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 24 1884 p. 549) bringt die Eier oder Larven in kaltes Wasser, erhitzt dieses allmählich bis auf 80° und legt sie nach dem Erkalten erst in Alkohol von 20 %, dann allmählich in immer stärkeren. Wheeler (Journ. Morph. Boston Vol. 3 1889 p. 292) schneidet die Eier aus den Ovarien unter Salzwasser heraus, fixirt sie $^1/_4$ Stunde lang in Perényis Gemisch (§ 50), dann in Alkohol. Die abgelegten Eier tödtet er entweder nach Patten durch Erhitzen, zerstört dann mit einer Pincette vorsichtig die Kapsel, holt die Eier heraus und härtet sie nach Belieben; oder er legt die Kapsel auf 10 Minuten in Pikrinschwefelsäure von 80 % und daraus in 70 %igen Alkohol. Dieser bringt die Wände der Kapsel zum Quellen, sodass sie leichter entfernt werden kann. Heymons (Zeit. Wiss. Z. 53. Bd. 1891 p. 434) schneidet die Kapsel an dem einen Ende auf, legt sie auf 2 Minuten in Wasser von 90° C. und öffnet sie in Chromosmiumessigsäure. Für Larven nimmt er entweder dieses Gemisch oder Sublimat. S. auch § 611.

615. Coleopteren. Lécaillon (Arch. Anat. Micr. Paris Tome 1 1897 p. 208) fixirt die Eier mit Zenkers Gemisch (assez fortement acidulé par l'acide acétique) bei 40° C. 24 Stunden lang und färbt die Schnitte mit Hämalaun.

616. Phalangiden. Henking (Zeit. Wiss. Z. 45. Bd. 1886 p. 86) fixirt die Eier mit heissem Wasser oder Flemmingschem Gemisch und härtet sie in 90%igem Alkohol, bringt sie dann aber in 70%igen zurück; hierdurch schwillt das Chorion an und kann leicht mit Nadeln entfernt werden.

617. Spinnen. Kishinouye (Journ. Coll. Sc. Japan Vol. 4 1891 p. 56; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 215) fixirt die Furchungsstadien durch kochendes Wasser, ältere Stadien durch Erwärmen in Wasser bis auf 70—80° C., bringt sie nach dem Erkalten in Alkohol von 70 %, sticht 24 Stunden später die nicht geplatzten Eihüllen mit einer Nadel an und härtet mit stärkerem Alkohol nach. Waren die Embryonen mit Pikrokarmin gefärbt, so drang das Paraffin besser ein. Auch Locy (Bull. Mus. Harvard Coll. Vol. 12 1885 p. 64; Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 242) verwendet zum Fixiren heisses Wasser; zum Durchfärben dient am besten Boraxkarmin nach Grenacher.

618. Skorpioniden. Brauer (Zeit. Wiss. Z. 57. Bd. 1894 p. 405) fixirt die dem lebenden *Euscorpius* entnommenen Ovarialröhren, wenn

die Eier noch klein sind, 1/2—1 Stunde lang in kaltem Flemmingschem Gemisch und präparirt dann die Eier heraus; die mit älteren Embryonen bringt er entweder auf 24 Stunden in 1/5 %ige Chromsäure oder erst auf 1—1 1/2 Minute in fast kochendes Wasser, dann auf 2—6 Stunden in Chromessigsäure oder auf 10—20 Minuten in Flemmings Gemisch; bei den mit Wasser getödteten entfernt er aber sofort im Härtgemisch das Epithel der Ovarialröhren. Die Konservirung mit Chromsäure eignet sich nur für Oberflächenbilder.

619. Tardigraden. Erlanger (Morph. Jahrb. 22. Bd. 1895 p. 493) fixirt die Eier von Tardigraden (und diese selber) theils in Flemmings Gemisch, theils in Pikrinschwefelsäure, der auf jeden ccm 1 Tropfen 1%iger Osmiumsäure zugesetzt war, theils in Sublimatessigsäure (konzentrirte Sublimatlösung mit 20% Eisessig). In den beiden ersten Gemischen wurden die Eier aber so schwarz, dass sie mit Wasserstoffhyperoxyd in der Wärme gebleicht werden mussten. Die Kerne färbten sich nie scharf, was Verf. auf ihre grosse Armuth an Chromatin zurückführen möchte. Die ganzen Embryonen kamen meist ungefärbt in Glycerin, die Paraffinschnitte wurden nachgefärbt.

620. Limulus. Kingsley (Journ. Morph. Boston Vol. 7 1892 p. 38) erhitzt die Eier in Seewasser auf 70—75 ° C. und bringt sie dann in Alkohol von 30—70 %; in frühen Stadien bezeichnet er die Lage des Embryos auf dem Chorion mit Tusche, die sich in Alkohol hält. Wegen der Härte des Dotters mussten solche Stadien in Celloidin eingebettet werden, später geht es mit Paraffin. Kishinouye (Journ. Coll. Sc. Japan Vol. 5 1893 p. 56) tödtet die Eier in Wasser von 60—70 °, bringt sie erkaltet direkt in Alkohol von 70 %, sticht nach 1—2 Tagen das Chorion an und härtet sie weiter in stärkerem Alkohol. Durchfärbung mit Boraxkarmin oder einem Hämateïnthonerdegemisch. Sehr gute Schnitte ergab die Einbettung in Celloidin-Paraffin.

621. Dekapoden. Reichenbach (Abh. Senckenberg. Ges. Frankfurt 14. Bd. 1886 p. 2; Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 400) erwärmt die Eier von *Astacus* langsam auf 60—70 ° C. (das Chorion platzt zuweilen, aber das schadet nicht), härtet sie dann 24 Stunden lang in Kaliumbichromat (1—2 %) oder in Chromsäure (1/2 %), wäscht sie ebenso lange mit Wasser aus und bringt sie in Alkohol von 70 und 100 %. S. auch oben § 79.

622. Amphipoden. Della Valle (Fauna Flora Golf. Neapel 20. Monogr. 1893 p. 170) giebt die Eier von *Orchestia* mit einer Pipette in kochende, kalt konzentrirte wässerige Sublimatlösung, saugt sie sofort wieder heraus, bringt sie in Seewasser und von da in schwachen Alkohol.

Das Chorion platzt entweder von selbst oder auf einen Stich mit einer Nadel, sodass der Jodalkohol etc. leicht eindringen können.

623. Isopoden. Mc Murrich (Journ. Morph. Boston Vol. 11 1895 p. 65) verwendet zum Fixiren der Eier von *Jaera* eine gesättigte Lösung von Pikrinsäure in 70 %igem Alkohol, dem 2 Volumprozente konzentrirter Schwefelsäure zugesetzt werden, und zum Färben Kleinenbergs Hämatoxylingemische. Ist der Dotter sehr brüchig, so bettet er in Celloidin, sonst in Paraffin ein.

Würmer.

624. Polychäten. Wilson (Journ. Morph. Boston Vol. 6 1892 p. 373) färbt die lebenden Embryonen von *Nereis* durch Zusatz von Methylenblau zum Seewasser und sieht so die Zellgrenzen und das Plasma deutlicher. Zum Fixiren verwendet er 10—30 Minuten lang besonders Flemmings und Perényis Gemisch; Pikrinschwefelsäure ist nicht gut, dagegen sehr brauchbar Sublimateisessig nach Lang; die beiden letzten Gemische wirken also umgekehrt wie nach Wistinghausen (Mitth. Z. Station Neapel 10. Bd. 1891 p. 47). Um die Eier in toto zu studiren, tödtet und konservirt er sie in einem Gemisch gleicher Theile von Glycerin, Wasser und Essigsäure und färbt davon nach Bedarf in Schneiders Essigsäurekarmin (etwa 3—5 Minuten lang), worauf er sie nach gutem Auswaschen mit demselben Glyceringemisch bald untersucht, ehe sie zu sehr nachdunkeln. Wistinghausen (l. c.) erhält bei älteren Embryonen von *Nereis* die besten Resultate durch einstündiges Fixiren mit einem modifizirten Flemmingschen Gemisch (1 %ige Osmiumsäure 1—1½, 1 %ige Chromsäure 25, 2 %ige Essigsäure 5, Wasser 70 Raumtheile), 24stündiges Auswaschen in Wasser und Uebertragen in Alkohol von 50 % (3 Stunden) und 70 %.

Korschelt (Zeit. Wiss. Z. 60. Bd. 1895 p. 545) findet für die Eier von *Ophryotrocha* die Pikrinessigsäure von Boveri (oben § 84) am geeignetsten: 3—4 Stunden lang, dann Alkohol von 70 % und 96 %.

Kleinenberg (Zeit. Wiss. Z. 44. Bd. 1886 p. 25) fixirt die Larven von *Lopadorhynchus* mit seiner Pikrinschwefelsäure (§ 78), bringt sie direkt in Alkohol von 70 %, dann von 90 % und färbt sie mit Boraxkarmin nach Mayer (§ 238); in Folge dieser scharfen Kernfärbung lassen sie sich beim Einbetten bequem orientiren. Ferner (ibid. p. 36) macerirt er sie 1—2 Stunden lang in verdünnter Pikrinschwefelsäure und nachher mehrere bis 24 Stunden lang in Beales Karmin: die Zellen lassen sich dann leicht isoliren.

Eisig (Mitth. Z. Stat. Neapel 13. Bd. 1898 p. 89) fixirt die Eier und Larven von *Capitella* mit Sublimat (5 % in Seewasser gelöst; hiervon 3 Theile unmittelbar vor dem Gebrauch zu mischen mit 1 Theil Eisessig); eventuell müssen die Larven vorher mit Cocaïn betäubt werden (2 % in Seewasser; der Niederschlag mit Sublimat löst sich später im Alkohol wieder auf). Dann Alkohol von 50, 70, 90 %. Zum Färben dient, da wässerige Mittel schädlich sind, Hämacalcium (aber mit 5 % Essigsäure statt mit 2 %), und die Ueberfärbung wird durch langes Verweilen der Eier in 70 %igem Alkohol mit 2 % Aluminiumnitrat korrigirt. Einschluss durch Cedernöl hindurch in Xylol- oder Cedernölbalsam. Nachfärbung der Schnitte mit Eosin in 90 %igem Alkohol.

625. Rotatorien. Jennings (Bull. Mus. Harvard Coll. Vol. 30 1896 p. 101) verwendet zum Fixiren der trächtigen Weibchen Pikrinschwefelsäure allein (ist schlecht) oder mit 10 % Eisessig (nach Henneguy), ferner Pikrinsalpetersäure, Sublimat in Alkohol gelöst (schrumpft stark), Sublimat und Formol, findet aber am besten Flemmings starkes Gemisch, nur muss man in diesem Falle die Eier mit Kaliumchlorat und Salzsäure (oben § 568) bleichen. Aufbewahrung in 80 %igem Alkohol oder in einem Gemisch gleicher Theile Alkohol, Wasser und Glycerin. Die Eier präparirt man unter dem Mikroskop frei und bringt sie in Glycerin unter ein Deckglas, das durch Stücke von Capillarröhren so gestützt ist, dass die Eier sich rollen lassen. Färbungen helfen nicht, da stets das Plasma mehr Farbe aufnimmt als die Kerne.

626. Turbellarien. Nach Gardiner (Journ. Morph. Boston Vol. 11 1895 p. 158) eignen sich für die Eier von *Polychoerus* in jungen Stadien die gebräuchlichen Fixirmittel sämmtlich nicht, da sie die Furchen zerstören; relativ das beste ist noch ein Gemisch von absolutem Alkohol und Eisessig zu gleichen Theilen.

Jijima (Zeit. Wiss. Z. 40. Bd. 1884 p. 361) öffnet die Eikapseln von Süsswasserplanarien auf dem Objektträger mit einer Nadel in einem Tropfen 2 %iger Salpetersäure, lässt die Eier heraustreten und legt ein Deckglas auf, das aber durch Wachsfüsschen oder Papier gestützt ist. Nach 1/2 Stunde lässt er unter das Deckglas erst Alkohol von 70, dann von 90 %, darauf verdünntes und zuletzt reines Glycerin treten. Zum Schneiden härtet er die ganze Kapsel in 1 %iger Chromsäure.

627. Cestoden. van Beneden (Arch. Biol. Tome 2 1881 p. 187) behandelt die Eier von *Taenia* zuerst mit 1 %iger Osmiumsäure, dann 1 Stunde lang mit 30 %igem Alkohol, wäscht sie mit Wasser, färbt sie 2—3 Tage lang mit Pikrokarmin und hebt sie in Glycerin mit etwas Pikrokarmin auf. Bei älteren Embryonen muss man aber zuvor die Chitinhülle sprengen, indem man unter dem Deckglase mit Filtrirpapier so viel Flüssigkeit wegsaugt, dass der Druck des Deckglases dazu stark genug wird.

628. Trematoden. Coe (Z. Jahrb. Abth. Morph. 9. Bd. 1896 p. 563 und 566) fixirt die Miracidien von *Distomum* mit den gebräuchlichen Mitteln; speziell zur Darstellung des Exkretionssystems tödtet er sie mit Osmiumsäure, spült sie mit destillirtem Wasser ab und lässt sie 2 Tage oder länger in 1/4 %iger Lösung von Höllenstein.

629. Nematoden. Boveri (Jena. Zeit. Naturw. 21. Bd. 1887 p. 423) fixirt die Eier von *Ascaris* in seiner Pikrinessigsäure (oben § 84), bringt sie dann direkt in Alkohol von 70 %, färbt sie mit Boraxkarmin und überträgt sie in ein Gemisch von 1 Theil Glycerin und 3 Theilen absol. Alkohol, von dem er alsdann den Alkohol langsam abdunsten lässt. — Zur Strassen (Arch. Entwickelungsmech. 3. Bd. 1896 p. 29) fixirt sie 24 Stunden lang in einem Gemisch von 4 Theilen Alkohol von 96 % und 1 Theil Essigsäure, bringt sie dann in reinen Alkohol, färbt sie mit Salzsäurekarmin (oben § 240) und führt sie allmählich in Glycerin über.

Zoja (Arch. Mikr. Anat. 47. Bd. 1896 p. 218) fixirt die Eier wie Herla im Gemisch von absol. Alkohol (5 Vol.) und Eisessig (1 Vol.) 24 Stunden lang, bringt sie von da auf 48 Stunden in eine konzentr. wässerige Lösung von Bismarckbraun und untersucht sie in Drittelglycerin. Zum Schneiden setzt er dem obigen Fixirgemisch etwas Platinchlorid (auf 2—3 ccm 1 Tropfen einer 10 %igen Lösung) zu und bringt die Eier 1—2 Tage später in absol. Alkohol, von da vorsichtig durch Chloroform in Paraffin. Färbung der Schnitte meist mit Bordeaux R und Eisenhämatoxylin. — Erlanger (ibid. 49. Bd. 1897 p. 309) eröffnet die Würmer in Normalsalzwasser von 37 ° C., fixirt die Eier in Alkohol mit Eisessig (1 Vol. auf 4 Vol. 95 %igen) und bringt sie ebenfalls durch Chloroform in Paraffin (von 54 ° C.). Zum Färben der ganzen Eier dient ein „Gemisch von gleichen Theilen Jodgrün und Bismarckbraun und ein anderes von 2 Theilen Jodgrün auf 1 Theil Säurefuchsin in 10 % Glycerin gelöst“. — Kostanecki & Siedlecki (Arch.

Mikr. Anat. 48. Bd. 1896 p. 184) fixiren die Eileiter 24 Stunden lang entweder in konzentr. Sublimatlösung (in Normalsalzwasser) oder in 3 %iger Salpetersäure oder in Gemischen dieser beiden Flüssigkeiten (auch mit absol. Alkohol) etc., bringen sie gradatim in absol. Alkohol und betten sie äusserst vorsichtig durch Chloroform in Paraffin (von 52°) ein. Die Eier dürfen aber höchstens 8 Stunden einer Temperatur über 35° ausgesetzt sein, sonst schrumpfen sie zu stark. Oder aus dem absol. Alkohol kommen die Eier allmählich in 30 %igen zurück, werden gefärbt (Hämalaun, Kernschwarz etc.) und in dünnes Glycerin gebracht, das durch Verdunsten konzentrirt wird.

S. wegen *Ascaris* auch p. 299.

25. Kapitel.

Methoden zur Untersuchung der Zelle.

630. Studium der lebenden Zelle. Eins der besten Objekte hierfür ist der Schwanz junger Larven von anuren oder urodelen Amphibien. Im lebenden Thiere sind die Epithelzellen und ihre Kerne in der Ruhe so durchsichtig, dass man sie nicht ohne Weiteres wahrnimmt, sondern nur, wenn man das Thier curarisirt oder noch besser es nach dem Curarisiren $^{1}/_{2}$ Stunde lang in 1 $^{0}/_{0}$iges Salzwasser legt. Zum Studium der Karyokinese kann man die Larven zwar ohne Weiteres verwenden, aber man spart viel Zeit, wenn man auch sie curarisirt.

Curare. Man löst 1 Theil davon in 100 Theilen Wasser und setzt ebenso viel Glycerin hinzu. Von diesem Gemisch giebt man in ein Uhrglas voll Wasser 5—10 Tropfen, für grössere Larven auch mehr, und lässt es $^{1}/_{2}$—1 Stunde einwirken. Die Larven dürfen aber nicht so lange darin bleiben, bis sie sich gar nicht mehr rühren, sondern sobald sie träge werden, nehme man sie heraus und lege sie auf einen Objektträger neben Filtrirpapier. Bringt man sie in Wasser zurück, so werden sie in 8—10 Stunden wieder ganz normal und können noch mehrmals curarisirt werden.

Aether. Aehnliche Wirkungen übt ein Zusatz von 3 $^{0}/_{0}$ Alkohol oder 3 $^{0}/_{0}$ Aether zum Wasser aus. Beide hindern die Zelltheilungen nicht, sind daher nützlich, betäuben aber nicht gleichmässig.

Indifferente Medien. Als solche dienen 1 $^{0}/_{0}$iges Salzwasser, Jodserum, Zuckersaft, kaltes Wasser (+ 1° C.) und warmes Wasser (35—40° C.). Man schneidet dem lebenden Thiere den Schwanz ab und kann ihn dann in einem solchen Medium lange Zeit studiren (Peremeschko in: Arch. Mikr. Anat. 16. Bd. 1879 p. 437).

Ueber die Färbung lebender Zellen s. oben § 213.

631. Studium frischer oder leicht fixirter Zellen. Flemming hat mit Recht darauf hingewiesen, dass die sogenannten indifferenten

Medien durchaus nicht ganz ohne Wirkung auf die Kerne sind; man sollte sie daher eher schwache Fixirmittel nennen. Zwischen ihnen und den energischen Mitteln, z. B. dem Flemmingschen Gemisch, stehen die mittelstarken Fixirmittel, wie Pikrinsäure oder ganz schwache Essigsäure, und diese gerade eignen sich zum Studium frischer isolirter Zellen.

Ein typisches Beispiel für diese Art von Verfahren ist folgendes: man zerzupft ein Stück lebendes Gewebe in einem Tropfen einer Lösung von Methylgrün, die mit $^3/_4$ $^0/_0$ Essigsäure versetzt ist. Dieses Gemisch tödtet die Zellen augenblicklich ohne Aenderung der Form. Dann setzt man das Präparat noch $^1/_4$ Stunde Osmiumdämpfen aus, giebt einen Tropfen des Gemisches von Ripart & Petit hinzu und deckt ein Deckglas darüber. Oder man lässt die Osmiumdämpfe nur $^1/_2$—2 Minuten auf das zerzupfte Gewebe wirken, setzt einen Tropfen von dem obigen Methylgrün zu, wäscht nach 5 Minuten mit 1$^0/_0$iger Essigsäure aus, giebt das Gemisch von R. & P. darauf und deckt das Deckglas darüber. Oder endlich man zerzupft direkt im Gemisch von R. & P. (eventuell mit einer Spur Osmiumsäure dazu) und färbt mit Methylgrün.

Ich habe das Chlormangan nach Pictet (§ 386) auch sehr nützlich gefunden; man mag ein wenig Dahlia hinzufügen. Auch das Gemisch von Henking (§ 612) mag gut sein.

Natürlich lassen sich auch andere Fixirmittel, z. B. Pikrinsäure oder schwache Lösung von Sublimat, mit Vortheil verwenden, manchmal ohne Zweifel mit noch grösserem als die obigen. Desgleichen werden unter Umständen andere Färbmittel, z. B. Bismarckbraun, und selbstverständlich auch andere Medien als das Gemisch von R. & P. nützlich sein. Im Allgemeinen jedoch giebt die obige Methode — Methylgrün, Osmiumsäure, Gemisch von R. & P. — so gute Resultate und ist zugleich so bequem, dass man sie wohl die klassische Methode zum Studium der frischen Zellen nennen darf.

632. Einige mikrochemische Reaktionen. Methylgrün ist ein Reagens auf Chromatin, insofern als es im Kern nur das Chromatin färbt. Allerdings ist es kein vollkommenes Reagens, denn die Farbe wechselt an Stärke nach den Kernen sehr, kann in einigen sehr schwach werden oder anscheinend sogar ganz fehlen. Dann aber muss man andere Reagentien anwenden, um die An- oder Abwesenheit des Chromatins sicher festzustellen. Ich gebe hier nach Carnoy, der

wohl unter den Zoologen als der einzige die Nothwendigkeit mikrochemischer Methoden in systematischer Weise zum Studium der Zelle betont hat, einige Winke.

Das Chromatin ist weder in Wasser noch in verdünnten Mineralsäuren (z. B. $^1/_{10}$ %iger Salzsäure) löslich, dagegen leicht in konzentrirten, ferner in Alkalien, selbst in sehr verdünnten, und in einigen alkalischen Salzen, wie Kaliumkarbonat und Natriumphosphat. In 10 %iger Kochsalzlösung schwillt es zu einer Gallerte an oder löst sich oft gänzlich (Biol. cellulaire p. 208). In den gebräuchlichen Verdaumitteln ist es, falls es im Kern liegt, nur theilweise verdaulich.

Zum Lösen des Chromatins eignen sich in der Praxis am besten 1 %ige Kalilauge, rauchende Salzsäure, Cyankalium oder Kaliumkarbonat. Letztere geben gewöhnlich bessere Resultate als verdünnte Alkalien und lassen sich in 40—50 %iger Lösung verwenden. Will man aus einem Kern alles Chromatin weglösen, so muss man das Reagens oft 2—3 Tage wirken lassen, namentlich wenn man das Präparat auf einem Objektträger unter dem Deckglase, was das Sicherste ist, damit behandelt. Aber man muss dazu frische Zellen verwenden, denn in den gehärteten ist das Chromatin fast unlöslich in Ammoniak, Kalilauge, Natriumphosphat etc. Nur die Salzsäure bringt es dann zum Quellen und löst es, allerdings schwierig.

Auch die partielle Verdauung eignet sich mitunter zum Studium des Chromatins in den Kernen. Es widersteht nämlich der Verdauung viel länger als die Albumine, und so kann man die Chromosomen von allen etwaigen karyoplasmatischen Einlegungen frei machen und zugleich das Cytoplasma aufhellen.

Ausdrücklich sei auf Zimmermann, Morphologie und Physiologie des pflanzlichen Zellkernes, Jena 1896, hingewiesen, weil darin ausführlich das mikrochemische Verhalten auch des thierischen Zellkernes erörtert wird.

633. Fixirmittel für Zellen. Viele von den folgenden Angaben habe ich den zahlreichen Schriften von Flemming (in Arch. Mikr. Anat. von 1879 ab, sowie in seiner: Zellsubstanz, Kern- und Zelltheilung) entnommen.

Osmiumsäure ($^1/_{16}$—2 %) konservirt die Form der Zelle, bringt aber die Kerne zum Quellen, rundet die Nucleoli ab und macht das Kerngerüst unkenntlich. Pikrinsäure (konzentrirt oder verdünnt) und Chromsäure ($^1/_{10}$—$^1/_2$ %) eignen sich für die Zellen der Wirbelthiere besser als Alkohol und andere Mittel. Allerdings hat man

Schrumpfungen und Verzerrungen der Kernfiguren (bei Pikrinsäure auch Quellungen) zu erwarten, aber bei anderen Mitteln ist das noch ärger; speziell Alkohol bringt die Kernfäden in Verwirrung. Ebenso Essigsäure, die ausserdem Quellungen schafft. Chromsäure in stärkerer Form bringt zum Schrumpfen. Von allen diesen Mitteln ist keins harmlos gegenüber den Kernen der Erythrocyten; am schlimmsten sind die Salze der Pikrinsäure (Kali-, Natron-, Barytsalz). Schwache (d. h. nicht über 1 $^0/_0$ige) Essigsäure, Salzsäure oder Salpetersäure lassen, wenn man später färbt und in Glycerin einschliesst, das Chromatin und die Nucleoli gut hervortreten. Goldchlorid erhält die Form gut, lässt aber gewöhnlich die Kerne ungefärbt. Höllenstein ist absolut unzuverlässig in seinen Wirkungen. Alkohol wirkt etwa wie Chromsäure, bringt aber oft die Kerne viel mehr zum Schrumpfen. Kaliumbichromat und Ammoniumchromat liefern ein sehr scharfes Kerngerüst, das aber nicht natürlich ist (Arch. Mikr. Anat. 16. Bd. 1879 p. 334 ff.). Zelltheilungen darf man nicht nach Präparaten, die mit chromsauren Salzen gewonnen sind, studiren wollen, denn diese konserviren zwar den Zellkörper gut, nicht aber den Kern: sie lösen die Nucleoli auf, zerstören das Chromatingerüst und verzerren die karyokinetischen Figuren derart, dass sie zu reinen Karikaturen werden. (S. auch oben § 95 die Angaben von Burckhardt über die Chromate.)

Altmanns Salpetersäure ist gewiss sehr gut zum Aufsuchen von Zelltheilungen, aber sie konservirt diese nicht sonderlich gut. Dies gilt auch von der Pikrinschwefelsäure (s. hierüber auch Holl in: Sitz. Ber. Akad. Wien 99. Bd. 3. Abth. 1890 p. 311; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 89).

Die wirklich klassischen Gemische zum Studium der Zellen sind Flemmings **Chromosmiumessigsäure** (oben § 46, 47) und Hermanns Platinosmiumessigsäure (§ 68). Ueber sein Gemisch giebt Flemming etwa folgende Aufschlüsse. Die Essigsäure oder Ameisensäure begünstigt die scharfe Färbbarkeit der Präparate mit Hämateïngemischen, Pikrokarmin oder Gentianaviolett; aber auch die Chromsäure darf nicht fehlen. Gemische von Pikrinsäure mit Osmiumsäure allein oder mit dieser und Essigsäure fixiren ebenso gut wie die mit Chromsäure, aber eine scharfe Färbung ist sogar noch schwerer zu erzielen als bei Osmiumsäure allein. Letztere tödtet die Zellen augenblicklich, während die anderen Säuren in dem Gemisch die Einzelheiten deutlich sichtbar machen. Man brauche daher die Gemische mit Osmiumsäure, wenn es darauf ankommt, die Kernfiguren möglichst getreu zu konserviren,

reine Chromsäure dagegen, wenn man das Hauptgewicht auf gute Färbbarkeit legt. Zum Studium der achromatischen Bestandtheile des Kerns empfiehlt Flemming seine Chromessigsäure (§ 43) und nachher ein Hämateïngemisch, zum Studium der Polkörperchen die Osmiumgemische oder reine Chromsäure und nachher Gentianaviolett.

Alle kompetenten Forscher geben zu, dass die Chromosmiumessigsäure im Allgemeinen wohl das beste Mittel zum Fixiren des Chromatins ist, jedoch finden einige, sie konservire das Protoplasma nicht immer gut. Ich selber meine, man darf sie nur ganz vorsichtig verwenden: man muss sie in der richtigen Stärke und auch nur auf sehr kleine Stücke Gewebe wirken lassen, sodass sie überall gleichmässig wirken kann und nicht beim Durchgang durch die äusseren Gewebsschichten verdünnt wird, bevor sie zum eigentlichen Objekte der Untersuchung gelangt; und jedenfalls soll man sie nicht unterschiedslos für allerlei Objekte verwenden.

Von seinen beiden Gemischen empfiehlt Flemming selber in erster Linie das starke, da es ein Mittel an die Hand gebe, das kinetische Chromatin vom ruhenden zu unterscheiden. Aber er hat es nicht als allgemein brauchbar empfohlen. Indessen ist es allmählich von manchen Forschern mit Vorliebe für andere Zwecke gebraucht worden als für den ganz speziellen, für den es Flemming zuerst bestimmt hatte. In vielen Fällen hat es auch wirklich gut gewirkt, nicht aber in allen, und zweifellos ist es, worauf Flemming selber hingewiesen hat, mitunter für Objekte verwandt worden, für die es nicht passte. Allgemeine Regeln über seine Verwendbarkeit lassen sich nicht geben, soviel aber lässt sich wohl sagen, dass in zweifelhaften Fällen das schwache Gemisch besser ist: nach meinen Erfahrungen ruft es nicht so leicht die Ueberfixirung der oberflächlichen Zellen und die Quellung ihrer Kerne hervor. In dieser Beziehung habe ich mit dem starken Gemische zuweilen Unannehmlichkeiten erlebt.

Die **Platinosmiumessigsäure** nach Hermann sucht, wie schon oben § 68 gesagt worden ist, ihre Superiorität über Flemmings Gemisch darin, dass sie das Cytoplasma und die achromatischen Figuren besser konservirt. Und dass dem so sei, ist die allgemeine Ansicht der Forscher, die damit gearbeitet haben. Flemming (Arch. Mikr. Anat. 37. Bd. 1891 p. 685) giebt zwar zu, dass sie die Spindelfasern, Centrosomen und Polkörperchen, scharf zeige, meint aber, seine eigenen Gemische konserviren die chromatischen Bestandtheile etwas

treuer. Nach meinen Erfahrungen bestehen im Verhalten beider Gemische leichte Differenzen, von denen man Nutzen ziehen kann (oben § 68): das Hermannsche bringt das Chromatin zu sehr zum Schrumpfen.

Niessing (Arch. Mikr. Anat. 46. Bd. 1895 p. 147) giebt zwei Modifikationen von Hermanns Gemisch an:

1) Platinchlorid in 10 %iger Lösung 25, Osmiumsäure in 2 %iger Lösung 20, Eisessig 5, Wasser 50 Theile; 2) dasselbe, aber statt Wasser gesättigte Sublimatlösung.

Ueber die Platinpikrinsäuren von O. vom Rath s. § 83. Auch Merkels Gemisch (§ 52) oder seine Modifikation von Brass (§ 877) mag von Nutzen sein. Das Gemisch von L. Johnson s. oben § 99.

Ferner mögen als besonders gute Fixirmittel für cytologische Studien die beiden Gemische von Rabl genannt werden. Zunächst seine **Chromameisensäure** (§ 44): man fixirt mit ihr die Objekte 12 bis 24 Stunden lang, wäscht sie gut mit Wasser aus und bringt sie in Alkohol. Ferner sein **Platinchlorid** (§ 67). Rabl (Anat. Anzeiger 4. Jahrg. 1889 p. 21) fixirt in der $^1/_{10}$—$^1/_8$ %igen Lösung Larven von *Salamandra* 24 Stunden lang; früher gebrauchte er sie stärker (1:300). Platinchlorid bringt übrigens nach Rabl das Chromatin ein wenig — ich sage beträchtlich — zum Schrumpfen und macht so die Pfitznerschen Körner und die Längstheilung der Chromosomen deutlich.

Hier wären nun noch einige Fixirmittel aufzuzählen, mit denen sehr wichtige Arbeiten ausgeführt worden sind. Indessen sind diese doch wohl nicht so ganz Mittel 1. Klasse für unseren Zweck, und die glänzenden Resultate hat man mit ihnen wohl eher trotz ihrer Mängel als mit Hülfe ihrer guten Eigenschaften erhalten. So ist der Alkohol mit Essigsäure ein Mittel, womit ein grosser Theil der Arbeiten über Reifung und Befruchtung des Eies von *Ascaris* ausgeführt worden ist. Aber es ist klar, dass für dieses äusserst undurchlässige Ei die Verwendung der so leicht eindringenden Essigsäure absolut erforderlich war, trotz der ernsten Mängel, die ihr eigen sind. Carnoy (La Cellule Tome 3 1886 p. 6) nahm zuerst ein Gemisch von 3 Theilen absolutem Alkohol mit 1 Theil Eisessig; später (ibid. 1887) das Gemisch mit Chloroform (oben § 72); 5—15 Minuten genügen auch für die resistentesten Eier. van Beneden & Neyt (Bull. Acad. Belg. (3) Tome 14 1887 p. 214) nehmen Alkohol und Eisessig zu gleichen Theilen oder sogar reine Essigsäure. Man wäscht den sauren Alkohol entweder mit reinem Alkohol oder mit verdünntem Glycerin aus (Calberlas Gemisch mag manchmal gut sein); Weiteres s. § 72 u. 629. Ganz vor Kurzem nun geben Carnoy & Lebrun (La Cellule Tome 13 1897 p. 64) an, dass von obigen Methoden keine einzige die Eier von *Ascaris* augenblicklich tödte, und dass sie alle entweder die Eier zerstören oder das Plasma vacuolär machen. Selber wenden sie zum Fixiren ein Gemisch von Gilson an: eine konzentrirte

Lösung von Sublimat in gleichen Maasstheilen von absolutem Alkohol, Eis-
und Chloroform; den an manchen Stellen angeschnittenen Ovidukt lassen sie
lange darin, bis er (nach etwa 10 Minuten) zu Boden sinkt, waschen ihn m
schwachem Alkohol gut aus und bringen ihn allmählich in 80%igen. B
Einbetten dürfen die Eier höchstens $1\frac{1}{2}$ Minute lang im warmen Paraffin ver-
weilen; s. im Uebrigen § 590 die Angaben über das Einbetten der Eier d
Batrachier. Celloidin dringt zwar auch in schwachen Lösungen frühestens i
14 Tagen durch die Eischale, mithin dauert die Einbettung wenigstens 2 Monat .
aber die Eier sind dann viel weniger geschrumpft als in Paraffin. Zum Färb
dient am besten Hämatoxylineisen nach Heidenhain (allein oder mit Congo
oder Bordeauxroth); das Kollodium wird zuletzt durch absoluten Alkohol er-
weicht und durch Cajeputöl aufgelöst; Einschluss in Kolophonium.

M. Heidenhain (Festschr. Kölliker Leipzig 1892 p. 113) verwendet Sublimat
hauptsächlich, weil hinterher die Präparate gewisse Färbungen so gut annehm
Die schönen Bilder von Attraktionssphären und anderen Strukturen im
Cytoplasma, die er in seiner Arbeit mittheilt, zeigen, welch prächtige Resultate
man damit erhalten kann. Indessen wollen mich seine Kernfiguren doch wenig
überzeugen. H. beschreibt und bildet ab als „Lanthanin" eine acidoph
Substanz im Kernplasma, die ein sehr feines Netzwerk zeigt. Mich erinnert sie
an die Gebilde, die ich vor Jahren mit Sublimat häufig in Kernen erhielt, ab
als Artefakte betrachtete, sodass ich auch das Sublimat nicht mehr angewendet
habe. Aus H.'s Arbeit geht mir nicht hervor, dass er irgend welche Versuch
angestellt hat, um die Präformation des Netzwerkes von „Lanthanin" im Kern
zu beweisen, und ich halte denn auch solche Experimente für nöthig, ehe man
die Existenz dieses Netzes und seine treue Erhaltung durch das Sublimat al
sicher betrachten darf. Ferner geben die mit Sublimat konservirten Objekte
mit Safranin, Gentianaviolett u. s. w. durchaus nicht so feine Differenzirung
wie die mit Chromosmiumessigsäure konservirten.

Ueber die Verwendung von Eisenchlorid zum Fixiren von Cilien und
Pseudopodien s. oben § 70.

634. Färbmittel für das Chromatin. Für frische oder schwach
fixirte Gewebe s. § 631. Für Schnitte durch gehärtete Objekte mag
man wählen zwischen den besseren Färbungen mit Hämateïngemischen
(oder Karmalaun) und denen mit Safranin, Gentianaviolett und einigen
anderen Theerfarbstoffen, z. B. Thionin, die man regressiv anwendet. Von
den Hämateïngemischen giebt Hämalaun mit Material aus Sublimat
sehr gute Resultate, dagegen ziehe ich für das aus Chromosmium-
essigsäure entschieden die Eisenverbindung nach Heidenhain oder
Benda vor.

Bataillon & Köhler (Compt. Rend. Tome 117 1893 p. 521) betrachten das
Methylenblau als ein „véritable réactif de la chromatine en mouvement": sie
fixiren das Blastoderm von Knochenfischen mit Flemmings Gemisch, färben es
in einer mit Borax versetzten Lösung von Methylenblau, waschen es flüchtig

ab, färben es mit einer wässerigen Lösung von Eosin nach und bringen es in Balsam.

635. Färbmittel für das Plasma. Ich kenne kein einziges, das wirklich befriedigte. Alle mir geläufigen sind nur unvollkommen electiv; es ist nämlich schwer, wenn nicht unmöglich, ihre Wirkung ganz sicher und scharf auf die Elemente in der Zelle zu beschränken, die man färberisch hervorheben möchte. Fast alle färben zu leicht das Enchylema oder Hyaloplasma zugleich mit dem Gerüst. Auf der anderen Seite giebt es viele wichtige Elemente, die sich nicht stark genug färben lassen. Die Spindeln z. B. nehmen Farbe an, aber auch im besten Falle nur ganz wenig; man kann sie nicht zugleich stark und distinkt färben.

Das beste, richtiger das am wenigsten mangelhafte Mittel für gehärtete Gewebe ist Kernschwarz (s. § 334 und Lee in: La Cellule Tome 11 1896 p. 257). Das Orange G nach Flemming wird zwar viel gebraucht und gelobt, aber ich empfehle es nicht, da es sehr launisch und nicht zuverlässig ist. Bendas Safranin und Lichtgrün oder Säureviolett giebt zuweilen prächtige Resultate, ist aber ebenfalls launisch. Für den Nebenkern ist es sehr gut, schon weniger für die Aequatorialspindelreste. Ueber Säurefuchsin und Orange s. § 305 und § 300. Das Gemisch von Ehrlich-Biondi (§ 306), viel gerühmt als Plasmafarbstoff, ist auch bei Material aus Chromosmiumessigsäure zu verwenden, nicht aber für Polkörperchen oder Spindelreste. Osmiumsäure und Pyrogallol (§ 378) giebt eine sehr schöne und oft nützliche Farbe, indessen empfehle ich sie doch nicht ganz in erster Linie.

Das Hämatoxylineisen nach Benda oder M. Heidenhain giebt je nach dem Grade des Auswaschens gute Plasmafärbungen. Das Heidenhainsche soll spezifisch die „Centrosomen“ färben, und das soll nach H. und anderen Forschern noch schärfer der Fall sein, wenn man vorher Bordeaux R anwendet. Letzteres, das zwar an das Chromatin und Plasma gehe, nicht aber an die Centrosomen, sättige die chemischen Affinitäten jener beiden Zelltheile dermaassen, dass sie die Eisenverbindung nicht mehr so zäh festhalten wie sonst, sondern sie beim Auswaschen wieder abgeben, während die Centrosomen noch zum Festhalten des Eisens frei seien. Diese Annahme wird von Heidenhain als die Theorie der subtraktiven Färbung, von Unna (Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1806 p. 454) als die der tinktoriellen Präoccupation bezeichnet. Vom Bordeaux R nimmt Heidenhain

(Arch. Mikr. Anat. 43. Bd. 1894 p. 665) eine „dünne" Lösung und tingirt damit die Schnitte von Material aus Sublimat 24 Stunden lang, bis sie so tief gefärbt sind, dass sie sich gerade noch für die mikroskopische Untersuchung mit starken Linsen eignen würden (l. c. p. 440 Anm.) Dann bringt er sie nach einander in den Eisenalaun und das Hämatoxylin und entfärbt sie zuletzt im Eisenalaun so lange, bis das Chromatin wieder fast oder ganz farblos geworden ist. Statt des Bordeaux R, das also nicht zum Färben des Plasmas dienen, sondern wie oben angegeben wirken soll, kann man auch Anilinblau nehmen.

Neuerdings giebt Heidenhain genauere Vorschriften für das Färben seiner Centralkörper (Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 186). Die Schnitte müssen sehr dünn sein: von Amphibien höchstens 5—6 μ, von Amnioten 3—4 μ. Zum Beizen nehme man die Lösung des Eisenalauns nicht schwächer als $2^1/_2$ % und stelle (nicht lege) die Objektträger mit den Schnitten 6—12, wenigstens aber 3 Stunden lang hinein. Nachher wasche man sie sorgfältig mit Wasser aus und färbe sie in einer 1 %igen Lösung von Hämatoxylin, die wenigstens 4 Wochen alt und dann mit dem gleichen Volum Wasser verdünnt sein muss. Diese Lösung brauche man immer wieder, denn zu Anfang färbt sie die Centralkörper nicht so gut wie nach einigem Gebrauche. Dann differenzire man in dem $2^1/_2$ %igen Eisenalaun, wasche 10 Minuten lang unter der Wasserleitung und bringe das Präparat durch die Alkohole und Xylol (ja nicht durch ein ätherisches Oel!) in Xylolbalsam. Die Differenzirung muss man, wenn das Cytoplasma schon hell geworden ist, noch etwas fortsetzen. (S. auch Heidenhain in: Morph. Arb. Schwalbe 7. Bd. 1897 p. 243, ferner unten § 890 u. oben § 263 u. 307).

Ich empfehle die obige Methode mit Bordeaux R und Hämatoxylineisen sehr als die beste mir bekannte zum Färben der Centrosomen. Uebrigens habe ich gute Färbungen sowohl der Centrosomen als auch des Plasmas mit Wasserblau und Safranin (oben § 326) erhalten und glaube, diese Methode wird sich oft als sehr nützlich erweisen. Ferner haben mir das Plasma gut gefärbt Ehrlichs Triacidgemisch und Ehrlichs acidophiles Gemisch; für manche Zwecke möchte ich diese dem von Ehrlich-Biondi vorziehen.

Hermann (Arch. Mikr. Anat. 37. Bd. 1891 p. 583) empfiehlt eine Modifikation der Palschen Färbung mit Hämatoxylin. S. auch Hermanns Schrift über die Methoden zum Studium des Archoplasmas etc. (Anat. Hefte 2. Abth. 2. Bd. 1893 p. 23). Ueber das Hämatoxylin-Vanadium von Heidenhain s. Cohn (Anat. Hefte 1. Abth. 5. Bd. 1895 p. 302; Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1896 p. 359).

Die achromatischen Theile im Ei von *Ascaris* werden nach van Beneden & Neyt (s. oben p. 299) am besten mit Essigsäure und Alkohol fixirt und dann in verdünntem Glycerin (1 auf 2 Wasser) mit einer Spur Malachitgrün gefärbt. Herla (Arch. Biol. Tome 13 1893 p. 423) empfiehlt ein Gemisch von 0,25 Vesuvin, 0,25 Malachitgrün, 10 Glycerin und 100 Wasser; Auswaschen mit verdünntem Glycerin.

636. Dotterkern. Er ist ohne Reagentien in den Eiern mancher Thiere, speziell der Arachniden zu sehen. Nach Balbiani (Z. Anzeiger 6. Jahrg. 1883 p. 659) wird er deutlicher durch Behandlung mit einem Gemisch von Essigsäure und 1%iger Osmiumsäure zu gleichen Theilen. S. auch Henneguy (Journ. Anat. Phys. Paris 29. Année 1893 p. 1), wo die ältere Literatur genau angegeben wird, und Balbiani (ibid. p. 145).

637. Zellgranula. Die meisten sind ohne Zweifel Produkte des Stoffwechsels. Am besten studirt man sie in Drüsenzellen oder Blut- und Lymphzellen, sowie in einigen Arten Bindegewebszellen. Allermeist färbt man sie mit den Gemischen von Ehrlich. Genaueres s. unten § 785 ff.

Ueber Altmanns Bioblasten s. dieses Autors: Studien über die Zelle (1. Heft Leipzig 1886) und: Die Elementarorganismen (Leipzig 1890, 2. Aufl. 1893), ferner Altmann in: Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. f. 1892 p. 223 (Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1893 p. 331) sowie R. & L. Zoja in: Mem. Ist. Lombardo Sc. Vol. 16 1891 p. 237. Erhalten werden sie durch Fixiren in einem Gemisch gleicher Theile einer 5%igen Lösung von Kaliumbichromat und einer 2%igen Osmiumsäure (24 Stunden lang), Einbetten in Paraffin, Färben der Schnitte auf dem Objektträger mit einer heissen Lösung von 20 g Säurefuchsin in 100 ccm Anilinwasser (oben p. 169), Auswaschen mit einer heissen Lösung von Pikrinsäure (die konzentrirte mit dem Doppelten an Wasser verdünnt) und Ueberführen durch Xylol in Balsam. Fischer (Anat. Anzeiger 9. Jahrg. 1894 p. 678; 10. Bd. 1895 p. 769) meint aber, sie beständen wenigstens zum Theil aus Präcipitaten von Albuminaten.

Eisenhaltige Körnchen im Deutoplasma der Eier von *Ostrea* weist Carazzi (Internation. Monatschr. Anat. Phys. 14. Bd. 1897 p. 134) auf die gewöhnliche Weise mit gelbem Blutlaugensalz und Salzsäure (s. § 638) nach, und zwar entweder direkt oder nach vorheriger Behandlung der aufgeklebten und vom Paraffin befreiten Schnitte mit den Dämpfen von Osmiumsäure; diese oxydire die organische Substanz und mache so das Eisen zugänglich. Ebenfalls mit Blutlaugensalz ermitteln Boyce & Herdman (Proc. R. Soc. London Vol. 62 1897 p. 35) die Gegenwart von Kupfer im Blute grüner Austern und bedienen sich dazu ferner (ibid. p. 36) nach dem Vorgange von Macallum (Rep. 66. Meet. Brit. Ass. Adv. Sc. 1897 p. 973: Unterscheidung von anorganischem und organischem Eisen in den Geweben) des Hämatoxylins in wässeriger

Lösung, das die kupferhaltigen, allerdings auch die eisenhaltigen Zellen blau färbt. — Ueber Eisen in den Geweben s. Macallum (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 38 1895 p. 175), Schneider (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1895 p. 208; ältere Literatur dort angegeben) und Carnoy & Lebrun (§ 638).

638. Nucleolus. Th. List (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p. 480) differenzirt in den Eiern von *Mytilus, Pholas, Pristiurus* und *Sphaerechinus* die Kernkörper durch Färbung mit Berlinerblau. Auf einen Schnitt von Material aus Sublimat lässt er 2 Tropfen einer 1 $^1/_2$ $^0/_0$igen Lösung von gelbem Blutlaugensalz etwa 5 Minuten lang einwirken, giesst den einen überflüssigen Tropfen ab und setzt 1 bis 2 Tropfen einer 1 $^0/_0$igen Salzsäure zu: das sich bildende Berlinerblau färbt den Nebennucleolus, während bei Nachfärbung mit Karmin der Hauptnucleolus roth wird. Unter Umständen ist es nöthig, den Präparaten zuerst Eisen einzuverleiben, indem die Objektträger auf $^1/_2$ Stunde in ein Bad von Eisenchlorid (10 Tropfen einer Lösung von $^1/_2$ g des an der Luft zerflossenen Salzes auf 100 Wasser werden vermischt mit 5 oder 15 Tropfen 1 $^0/_0$iger Salzsäure und 50 g Wasser) kommen. Auch in anderen Geweben lässt sich auf diese Weise der Nucleolus färben, nur muss das Bad von Eisenchlorid stärker sein. Ferner wird der Schleim in den Schleimzellen tief blau. (Auch Eisenacetat und -tartrat sind verwendbar, jedoch hat List hierüber seine Versuche noch nicht abgeschlossen.) — Ueber Eisen in den Nucleoli s. Carnoy & Lebrun (La Cellule Tome 12 1897 p. 275).

Für Pflanzenzellen giebt Zimmermann (Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1896 p. 463) eine Doppelfärbung mit Jodgrün[1]) und Fuchsin (1 Vol. konzentr. wässerige Lösung von Fuchsin und 9 Voll. einer $^1/_{10}$ $^0/_0$igen wässerigen Lösung von Jodgrün; das Gemisch hält sich nur wenige Tage) an: Chromosomen fast stets grün, Nucleolen roth.

[1]) Auch Methylgrün lässt sich verwenden, und statt des Fuchsins auch Safranin. Mitunter habe ich eine schärfere Differenzirung der Farben durch kurzes Einlegen des entwässerten Schnittes in Nelkenöl erreicht. Die Präparate sind jetzt 1 $^1/_2$ Jahr alt und noch gut, jedoch die von thierischen Zellen (Darm von Säugethieren) überhaupt nicht so elektiv gefärbt wie die von Phanerogamen. [M.]

26. Kapitel.

Methoden zur Untersuchung der Haut.

639. Epithel. Eine der besten Methoden, um instruktive Ansichten der Oberfläche von Epithelien zu erhalten, ist die mit Höllenstein. Hierüber s. oben § 358 ff., sowie Ranviers Traité techn. 1. Ed. p. 246 ff. und Tourneux & Hermann (Journ. Anat. Phys. Paris 12. Année 1876 p. 200). Ferner kann die Methode von Hoggan mit Eisen und Pyrogallussäure (oben § 380), sowie die mit Osmiumsäure und Pyrogallussäure (oben § 378) hier gute Dienste leisten, in vielen Fällen jedoch wird ohne Zweifel die Imprägnation mit Methylenblau vorzuziehen sein.

Schnitte erhält man leicht nach den gewöhnlichen Methoden. Das beste Mittel zum Härten der Haut scheint Müllers Gemisch zu sein; so wenigstens nach F. E. Schulze (Arch. Mikr. Anat. 3. Bd. 1867 p. 145), Tizzoni (Bull. Sc. Med. Bologna 1884 p. 259; Arch. Ital. Biol. Tome 6 1884 p. 378) und Behn (Arch. Mikr. Anat. 39. Bd. 1892 p. 581). Eine Lösung von Kaliumbichromat wirkt aber wohl eben so gut.

Für Drüsenepithel nimmt man häufig besser ein Chromsäuregemisch oder Osmiumsäure (z. B. nach Ranvier l. c. p. 258 ff.) oder absoluten Alkohol (Blaue in: Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. f. 1884 p. 231), während Pikrinschwefelsäure nicht so gut ist.

Macerirmittel. Für weiche Epithelien nimmt man sanfte Mittel, wie Jodserum, Drittelalkohol, Speichel oder das Gemisch von Calberla (oben § 520) oder Normalsalzwasser von 0.75 % (Bizzozero in: Internation. Monatschr. Anat. Phys. 2. Bd. 1885 p. 278); für harte Epithelien so energische Mittel wie die 40 %ige Kalilauge. Minot (Amer. Natural. Vol. 20 1886 p. 575) macerirt mehrere Tage in Normalsalzwasser (0.6 %) mit 0.1 % Thymol, um die Epidermis von Embryonen zu isoliren und die Entwicklung der Haare zu verfolgen. Mitrophanow (Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 513) legt einen Embryo von *Siredon* auf 1/4 Stunde in 3 %ige Salpetersäure

dann in Drittelalkohol; bereits nach 1 Stunde löst sich die Epidermis in Fetzen ab, und ist der Embryo 24 Stunden lang in stärkerem Alkohol gewesen, so geht sie fast ganz herunter. Löwy (Arch. Mikr. Anat. 37. Bd. 1891 p. 159) empfiehlt zur Ablösung der Epidermis vom Corium ein 24—48stündiges Maceriren in 6 % igem Holzessig bei etwa 40° C. Auch $^1/_3$ % ige Essigsäure ist gut (Philippson in: Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 222).

S. Mayer (Lotos Prag (2) 12. Bd. 1892) empfiehlt zur Untersuchung der Epidermis von *Rana*, *Bufo* und *Mus*, Stücke der Hornhaut oder Nickhaut $^1/_2$—1 Minute lang den Dämpfen von Essigsäure auszusetzen und dann in Salzwasser ($^1/_2$ %) zu bringen; bei gewöhnlicher Haut von *Rana* lässt sich dann die Epidermis vom Corium durch Streichen mit einer Nadel leicht trennen.

Flimmerepithel. S. unten § 831.

640. Epidermis von Fischen. Reid (Phil. Trans. Vol. 185 B 1894 p. 345) macerirt die Haut von *Anguilla* 24—48 Stunden lang in Ranviers Drittelalkohol oder einige Tage lang in $^1/_{10}$ % iger Osmiumsäure. Zu Schnitten ist am besten die Fixirung in Flemmings Gemisch oder in 10 % iger Salpetersäure (24 Stunden lang) und nachher in 1 % iger Osmiumsäure (eben so lange). Färbung in toto oder der Paraffinschnitte mit den gebräuchlichen Mitteln.

Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 8. Bd. 1888 p. 352) macerirt die Haut von Selachiern (besonders *Raja*) einige Stunden lang in einem Gemisch von 80 Maasstheilen Essigsäure (von 50 %), 150 Theilen 1 % iger Chromsäure und 750 Theilen Wasser.

Kapelkin (Bull. Soc. Natural. Moscou (2) Tome 10 1897 p. 498) fixirt die Haut von *Petromyzon* in Sublimat oder Sublimatplatinchlorid oder 70 % igem Alkohol mit Jod, macerirt sie in Drittelalkohol oder Müllers Gemisch und imprägnirt sie mit Silber (frisch mit $^1/_2$ % iger Lösung von Höllenstein; oder nach Golgi) oder mit Gold (nach Ranvier). Färbung in toto oder der Schnitte wie gebräuchlich.

641. Stachelzellen und Intercellularkanäle. Ausser der Maceration, die eine der besten Methoden hierfür ist, mag die Imprägnation gute Dienste leisten. Mitrophanow (Zeit. Wiss. Z. 41. Bd. 1884 p. 302; Arch. Anat. Phys. Phys. Abth. f. 1884 p. 191) wäscht den Schwanz einer Larve von *Siredon* mit destillirtem Wasser ab, legt ihn auf 1 Stunde in $^1/_4$ % iges Goldchlorid (mit 1 Tropfen Salzsäure auf ein Uhrglas voll), wäscht ihn wieder und reduzirt das Gold in einem Gemisch von

1 Theil Ameisensäure und 6 Theilen Wasser. S. hierüber ferner Ide (La Cellule Tome 4 1888 p. 409 und Tome 5 1889 p. 321) sowie Flemming (Anat. Hefte 1. Abth. 6. Bd. 1895 p. 1), der die Resultate der Versilberung discutirt.

642. Keratohyalin. Unna (Monatschr. Prakt. Dermat. 20. Bd. 1895 p. 69; Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1897 p. 337) giebt eine Menge Methoden zur Färbung des Keratohyalins in Schnitten durch die Hohlhand, Fusssohle etc. des Menschen an. Man überfärbt mit Hämateïnthonerde, legt dann die Schnitte auf 10 Sekunden in eine Lösung von Kaliumhypermanganat 1 : 2000, dann in Alkohol; oder nach der Färbung auf 10 Minuten in eine 33 $^0/_0$ ige Lösung von Eisenvitriol u. s. w. (Die Kerne färbt man hinterher mit Safranin.) Oder man färbt mit Pikrokarmin oder mit Mayers alkoholischem Karmin. Ferner lassen sich auch Säurefuchsin, Wasserblau, Fuchsin, Safranin, polychromes Methylenblau und Gentianaviolett verwenden, dabei werden aber meist komplizirte Beizen oder Entfärbmittel nöthig.

643. Plasmafasern im Epithel. Kromayer (Arch. Mikr. Anat. 39. Bd. 1892 p. 141; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1893 p. 355) färbt die Schnitte durch menschliche Haut 5 Minuten lang in einem Gemisch von Anilinwasser (oben p. 169) und konzentrirter wässeriger Lösung von Methylviolett 6 B zu gleichen Theilen. Dann wäscht er sie gut und behandelt sie mit einer Lösung von Jodjodkalium, bis sie blauschwarz werden (in 1—30 Sekunden), wäscht sie wieder, trocknet sie mit Filtrirpapier ab, behandelt sie mit einem Gemisch von 1 Vol. Anilin und 2 Vol. Xylol bis zur guten Differenzirung und bringt sie endlich in reines Xylol. (Sehr dünne Schnitte erfordern mehr Xylol im Verhältniss zum Anilin, nämlich 1 : 3 oder 1 : 4, dickere mehr Anilin, nämlich 3 : 5 oder 3 : 3.) Gentiana- und Kristallviolett färben auch, aber nicht ganz so gut. S. im Uebrigen Ehrmann und Jadassohn (Arch. Dermat. Syph. f. 1892 p. 303; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1893 p. 356).

Unna (Monatschr. Prakt. Dermat. 19. Bd. 1894 p. 1 u. 277; Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1895 p. 61 u. 63) giebt eine ganze Reihe minutiöser Vorschriften, von denen einige hier kurz erwähnt werden mögen: 1. Wasserblau und Orceïn. Man färbt die Schnitte 10 Minuten lang in einer 1 $^0/_0$ igen Lösung von Wasserblau, wäscht sie mit Wasser und bringt sie auf 5—10 Minuten in eine neutrale alkoholische 1 $^0/_0$ ige Lösung von Grüblers Orceïn, um sie dann zu entwässern und in Balsam einzuschliessen. Varianten dieser Methode sind: a) 1 Minute

oder 10 Minuten in W., 30 und mehr in O.; b) statt des O. eine saure Lösung von O. 2. Man färbt wenigstens $^1/_2$ Stunde lang in Hämalaun, wäscht $^1/_2$ Minute in konzentrirter wässeriger Lösung von Pikrinsäure, dann eben so lange in Alkohol mit $^1/_2$ % Pikrinsäure. 3. Hämalaun 2 Stunden, neutrales Orceïn (wie oben) 10—20 Minuten.

644. Horn, Haare, Nägel. Die Elemente von Haaren und Nägeln isolirt man durch langes Maceriren in 40 %iger Kalilauge oder durch Erhitzen mit konzentrirter Schwefelsäure. S. auch Nathusius (Z. Anzeiger 15. Jahrg. 1892 p. 395).

Günther (Haarknopf und innere Wurzelscheide. Dissert. Berlin 1895 p. 8) färbt die Paraffinschnitte von Haaren mit Böhmerschem Hämatoxylin, entfärbt sie mit Salzsäure-Alkohol, bläut sie in Wasser mit etwas Ammoniak, färbt sie mit Methyleosin und Pikrinsäure in wässeriger Lösung und bringt sie in Balsam. Ferner macerirt er theils frische, theils in Müllers Gemisch fixirte Haare bei 40° C. 2 Stunden bis 3 Tage lang in „Pepsin-Salzsäure-Glycerin“.

Horn färbt sich gut mit Safranin oder Gentianaviolett (Reinke in: Arch. Mikr. Anat. 30. Bd. 1887 p. 183). Ernst (ibid. 47. Bd. 1896 p. 669) untersucht die Verhornung in der Haut und in anderen Organen nach der Methode von Gram (oben p. 171); s. jedoch die Kritik von H. Rabl (ibid. 48. Bd. 1896 p. 489).

645. Tasthaare. Ranvier (Traité 1. Ed. p. 914) empfiehlt zum Studium der Nervenenden Ameisensäure und Goldchlorid (oben § 371): das Tasthaar wird mit seinem Bulbus, nachdem die Kapsel eingeschnitten ist, auf etwa 1 Stunde in das Gemisch gelegt, dann das Gold in leicht angesäuertem Wasser reduzirt, darauf das Haar in Alkohol völlig gehärtet und geschnitten.

646. Hautnerven. Wolters (Arch. Dermat. Syph. f. 1892; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1893 p. 360) verwendet hierfür Hämatoxylin und Vanadium (s. unten § 735).

647. Intraepidermoidale Nervenfasern. Ranvier (Traité 1. Ed. p. 900) empfiehlt für sie seine Methode mit Ameisensäure und Goldchlorid (oben § 371). Die Hautstücke werden nach der Reduktion in Alkohol gelegt, der sie weiter härtet und die Reduktion zum Stillstand bringt, und dann geschnitten. Für die Tastmenisken in der Schnauze von *Sus* und *Talpa* empfiehlt er (p. 910) ausserdem sein Goldchlorid mit Citronensaft (oben § 372).

Auch die Imprägnation mit Methylenblau dürfte sich hier gut erweisen.

648. Tastkörperchen. Fischer (Arch. Mikr. Anat. 12. Bd. 1876 p. 366) vergoldet sie nach Löwit (oben § 370). Ranvier (Traité 1. Ed. p. 918) empfiehlt diese Methode, aber auch seine beiden eigenen (oben § 371 u. § 372). Die Haut wird erst vergoldet, dann in Alkohol gehärtet und geschnitten. Gleich anderen Forschern findet Ranvier Osmiumsäure und Pikrokarmin vortrefflich zum Studium der Tastkörperchen und der Pacinischen Körperchen. Auch Purpurin oder Hämateïnthonerde eignen sich zum Nachfärben. Man sehe ferner Langerhans (Arch. Mikr. Anat. 9. Bd. 1873 p. 730), Kultschitzky (ibid. 23. Bd. 1884 p. 362) und Smirnow (Internation. Monatschr. Anat. Phys. 10. Bd. 1893 p. 241; Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 254), der neben der Vergoldung nach Löwit die rasche Methode von Golgi empfiehlt.

649. Herbstsche und **Grandrysche Körperchen.** Dogiel (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. f. 1891 p. 182; Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1892 p. 520) injizirt eine 4 %ige Lösung von Methylenblau blutwarm (40° C.) in die Adern am Kopfe von *Anser* oder *Anas*, nimmt dann Stücke von der Schnabelhaut, schneidet sie in Hollundermark, befeuchtet die Schnitte auf dem Objektträger mit Humor aqueus oder vitreus vom Thiere selbst (der mit etwas $^1/_{15}$ %iger Methylenblaulösung vermischt ist) und legt sie so einige Minuten an die Luft. Nach etwa 10—30 Minuten sind die Nervenenden gefärbt, und dann kommen die Schnitte in Ammoniumpikrat etc. (s. oben § 293). Geberg (Internation. Monatschr. Anat. Phys. 10. Bd. 1893 p. 205; Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 244) verwendet ebenfalls diese Methode, ferner aber Osmiumsäure und die Goldmethode von Arnstein. Nach dieser legt man die Haut auf 24 Stunden in Kalkwasser, zieht nun die Hornschicht leicht ab, schneidet die Haut in kleine Stücke und bringt diese auf 5 Minuten in $^1/_4$ %ige Lösung von Goldchlorid. Schon nach einigen Minuten sind die Stücke braun und kommen auf 24 Stunden in destill. Wasser; alsdann wird das inzwischen entstandene körnige Präcipitat durch Einlegen der Stücke in $^1/_4$ %ige Lösung von Cyankalium und kräftiges Bepinseln mit einem Pinsel aus Kameelhaar entfernt. Zuletzt Einlegen in Dammar. Geberg verwendet das Goldchlorid doppelt so stark und $^1/_2$ Stunde lang.

S. ferner die Methode von Carrière (Arch. Mikr. Anat. 22. Bd. 1882 p. 146) und die früheren Auflagen dieses Buches.

650. Meissnersche und **Krausesche Körperchen** in der Cornea und der Conjunctiva. Dogiel (Arch. Mikr. Anat. 37. Bd. 1891 p. 602; 44. Bd. 1894 p. 15) schneidet das in toto herausgenommene Auge eines Menschen parallel zum Aequator 5—8 mm hinter dem Rande der Cornea auf, nimmt Linse etc. heraus, belässt aber die Conjunctiva im Zusammenhang mit der Cornea, schneidet sie dann in Stücke, färbt diese 1—1 $^1/_2$ Stunde lang in Methylenblau plus Humor aqueus und behandelt sie weiter nach der gewöhnlichen Methode (oben § 293). — Man vergl. auch Longworth (Arch. Mikr. Anat. 11. Bd. 1875 p. 655).

651. Aehnliche Objekte. Papillae foliatae: Drasch (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 492); Hermann (ibid. 5. Bd. 1888 p. 524); Arnstein (ibid. 13. Bd. 1897 p. 240). Riechorgane der Vertebraten: Dogiel (Arch. Mikr. Anat. 29. Bd. 1887 p. 74). Organe des 6. Sinnes bei den Amphibien: Mitrophanow (Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 613; hierin auch Einzelheiten über Färbung mit Wasserblau, s. auch Biol. Centralbl. 7. Bd. 1887 p. 175). Nervenenden in der Zunge von *Rana*: Fajersztajn (Arch. Z. Expér. (2) Tome 7 1889 p. 705; Zeit Wiss. Mikr. 7. Bd. 1889 p. 357: besonders Methylenblau). Zunge von *Lepus cuniculus:* Lenhossék (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 377: Methode von Ramón y Cajal, s. unten § 744).

652. Cornea. Sie lässt sich hauptsächlich auf dreierlei Art studiren: mit Methylenblau (s. oben Kapitel 15, besonders § 295 und 296), mit Silber und mit Gold.

Negative Bilder der Corneazellen erhält man leicht nach Klein, indem man von der lebenden Cornea das Epithel der Conjunctiva abpinselt und dann die Cornea mit einem Stifte Höllenstein gut bestreicht. Nach 1 Stunde untersucht man die Cornea in destillirtem Wasser. Um positive Bilder der fixirten Zellen zu gewinnen, macerirt man nach Ranvier die Cornea, die wie eben gesagt präparirt worden ist, 2—3 Tage lang in Wasser; hierin findet eine sekundäre Imprägnation statt, und so treten die Zellen äusserst scharf hervor. Oder man cauterisirt die Cornea am lebenden Thiere, wie oben gesagt, lässt sie aber noch 2—3 Tage auf dem Auge, bevor man sie ausschneidet, oder man behandelt die negativ imprägnirte mit schwachem Salzwasser oder verdünnter Salzsäure (His).

Die besten positiven Bilder liefert aber Goldchlorid. Ranvier zieht seine Methode mit Citronensaft (§ 372) allen anderen vor; die

Cornea darf jedoch nicht zu lange im Goldbade bleiben, sonst imprägniren sich nur die Nerven gut.

Rollett (Strickers Handbuch p. 1115) empfiehlt die doppelte Imprägnation, um negative Goldbilder zu erhalten. Hat man die Cornea nur kurz mit $\frac{1}{2}$ %iger Lösung von Höllenstein behandelt und das Silber reduzirt, so legt man sie in eine ebenso starke Lösung von Goldchlorid; die braune Farbe des Silbers verschwindet sofort, und nach einigen Minuten setzt man das Präparat in angesäuertem Wasser dem Licht aus: die Grundsubstanz zeigt bald das bekannte Blau des reduzirten Goldes, aber auch die Zellen bleiben an ihrer Körnelung und hellgelben Farbe kenntlich.

Renaut (Compt. Rend. Tome 90 1880 p. 137) legt die Cornea von *Rana* auf 10 Minuten in 20 %ige Ameisensäure, dann auf 24 Stunden in 1 %iges Goldchlorid und ebenso lange in 33 %ige Ameisensäure. — Die Methode von Hoyer s. oben p. 218.

653. Cornea (andere Methoden). Rollett (Strickers Handbuch p. 1102) setzt eine frische Cornea, die in einer feuchten Kammer in Humor aqueus liegt, den Dämpfen von Jod aus und entfernt das Epithel, sobald sie braun geworden ist. Hat sie genug Jod aufgenommen, so sieht man unter dem Mikroskope die Corneazellen kaum minder deutlich als mit Goldchlorid. Die Methode schlägt nie fehl, was beim Goldchlorid mitunter der Fall ist. — Zur Isolirung der Fasern macerirt man die Cornea in einer Lösung von Kaliumhypermanganat (Stärke wird nicht angegeben) oder in einem Gemisch davon mit Alaun. Ist sie braun geworden, so schüttelt man sie in einem Reagensglase mit Wasser.

Tartuferi (Anat. Anzeiger 5. Jahrg. 1890 p. 524; Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 346) macht die Corneazellen und ihre Ausläufer mit Natriumhyposulfit und Chlorsilber deutlich.

654. Kristallinse. Löwe (Arch. Mikr. Anat. 15. Bd. 1878 p. 557) härtet sie in Kaliumbichromat; das dauert aber wenigstens $1\frac{1}{2}$ Jahr. Auch Formaldehyd ist dazu brauchbar (Gebhardt in: Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 306). Man macerirt sie nach M. Schultze in Schwefelsäure (oben § 535).

27. Kapitel.

Methoden zur Untersuchung der Muskeln und der Nervenenden darin und in den Sehnen.

Quergestreifte Muskeln.

655. Muskelzellen. Hierüber und über verwandte Objekte s. unter Anderem Behrens, Kossel & Schiefferdecker, Das Mikroskop 2. Bd. 1891 p. 154 ff.; Knoll (Sitz. Ber. Akad. Wien 98. Bd. 3. Abth. 1890 p. 456); Rollett (Denkschr. Akad. Wien 49. Bd. 1885 p. 81; 51. Bd. 1886 p. 23; 53. Bd. 1887 p. 193; Arch. Mikr. Anat. 32. Bd. 1888 p. 233; Sitz. Ber. Akad. Wien 98. Bd. 3. Abth. 1889 p. 169); Kölliker (Zeit. Wiss. Z. 47. Bd. 1888 p. 689); ferner über die Verwendung von Goldlösungen zum Studium der Muskelzellen Schäfer (Proc. R. Soc. London Vol. 49 1891 p. 280).

Rutherford (Journ. Anat. Phys. London Vol. 31 1897 p. 314) fixirt die quergestreiften Muskeln in 10%igem Formol 48 Stunden lang und bringt sie dann direkt in Alkohol von 90% oder zerzupft sie nach Zusatz von 50%iger Essigsäure oder in Eisessig selber. Zum Färben dient Eosin und noch besser „Heliocin", ferner Methylblau und Eosin. — M'Dougall (ibid. p. 432) fixirt die Muskeln entweder in Normalsalzwasser durch Wasserdampf oder mit 10%igem Formol oder 2%iger Chromsäure. — Rouget (Arch. Phys. Paris 29. Année 1897 p. 677) fixirt die quergestreiften Muskeln (sammt ihren Nervenendplatten) in 25%iger Lösung von Kochsalz wenigstens 2 Tage lang und behandelt sie später, um sie wieder durchsichtig zu machen, mit 1/10%iger Salzsäure.

656. Sarkolemm. S. hierüber § 655; ferner Solger (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 189): frischer Muskel wird in kalt gesättigter Lösung von Ammoniumkarbonat zerzupft uud untersucht.

657. Dissociation. S. oben im Kapitel 22, besonders § 532 u. 533.

658. Nervenenden. Zum Studium der Nervenenden im Muskel sind die 4 Hauptmethoden die mit Methylenblau, mit Gold, mit Silber und mit Silberbichromat nach Golgi. S. hierüber § 659—662.

659. Nervenenden. Die Methode mit **Methylenblau.** Allgemeines hierüber s. oben Kapitel 15. Biedermann (s. § 291, ferner Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1891 p. 65) imprägnirt bei *Astacus* zunächst die Muskeln mit Methylenblau, öffnet dann den Krebs und lässt die Muskeln in einer geräumigen feuchten Kammer 2—6 Stunden lang an der Luft liegen, um so die Färbung zu differenziren. Die besten Resultate geben die Rumpf- und Schwanzmuskeln. In *Hydrophilus piceus* injicirt B. eine $^1/_2$ %ige Lösung von Methylenblau ventral zwischen die hintersten Abdominalringe und lässt die Thiere im Wasser noch 3—4 Stunden leben, öffnet dann den Thorax durch zwei seitliche Schnitte, nimmt die Muskeln der Vorderbeine heraus, legt sie 3 bis 4 Stunden lang in einer feuchten Kammer an die Luft und untersucht sie zuletzt in Salzwasser.

Gerlach (Sitz. Ber. Akad. München 19. Bd. 1889 p. 125; Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 220) injicirt einem Frosch durch die Abdominalvene oder die Aorta 4—5 ccm einer Lösung von 1 g Methylenblau in 400 ccm 1 %igem Salzwasser und untersucht die Muskeln (besonders die am Kopfe oder Auge) im Serum des Thieres, fixirt dann die Präparate in Ammoniumpikrat und schliesst sie in Glyceringelatine ein. — Die Methode von Dogiel s. oben § 291.

660. Nervenenden. Die **Vergoldung.** Ueber die Methode von Fischer s. oben § 370. Aehnlich wie er verfährt Biedermann (s. § 659) an *Astacus*, lässt aber die Vorbehandlung mit Ameisensäure fort und legt die Muskeln nach der Reduktion in der Säure auf einige Tage in Glycerin. Auch Trinchese (Mem. Accad. Bologna (5) Tome 2 1892 p. 279; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 238) bedient sich im Wesentlichen derselben Methode. Ranvier (Traité 1. Ed. p. 813) empfiehlt für die motorischen Enden der Batrachier seine Methode mit Citronensaft (§ 372). Auch die motorischen Platten von Fischen, Reptilien, Vögeln und Säugern kommen (p. 826) mit seiner Ameisensäure (§ 371) besser heraus, als nach Löwit, noch besser aber mit Citronensaft, besonders bei Eidechsen und Säugern.

661. Nervenenden. Die **Versilberung.** Ranvier (ibid. p. 810) behandelt nach Cohnheim ein Stück vom Gastrocnemius des Frosches nach sehr sorgfältigem Zerzupfen in frischem Serum 10—20 Sekunden lang mit einer Lösung von Höllenstein (2 bis 3 : 1000) und bringt es dann in destillirtem Wasser an helles Licht, am besten in die Sonne. Ist es schwarz oder braun geworden, so wird es in 1 %ige Essigsäure gelegt

und bleibt darin so lange, bis es wieder auf die normale Dicke gequollen ist (es war im Höllenstein geschrumpft). Zur Beobachtung kommt es in Glycerin und Wasser zu gleichen Theilen. Man erhält so (im Gegensatze zur Vergoldung) negative Bilder: die Muskeln sind braun, die Nervenenden farblos.

662. Nervenenden. Die Methode mit **Silberchromat.** Ramón y Cajal (Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 332) legt frische Muskeln von Insekten auf 12—24 Stunden in ein Gemisch von 4 Theilen 3 %iger Lösung von Kaliumbichromat und 1 Theil einer 1 %igen Osmiumsäure, dann auf 24 Stunden in eine $^3/_4$ %ige Lösung von Höllenstein, dann in Alkohol von 40° (wahrscheinlich Baumé, also etwa von 90 %), endlich in Nelkenöl, verharztes Terpentinöl und (wenn ich R. recht verstehe) in Balsam.

663. Nervenenden. Andere Methoden (Genaueres s. in den früheren Auflagen der englischen Ausgabe): Bremer (Arch. Mikr. Anat. 21. Bd. 1882 p. 195); Ciaccio (Arch. Ital. Biol. Tome 3 1883 p. 75; Journ. Micr. Paris Tome 7 1883 p. 38); Wolff (Arch. Mikr. Anat. 19. Bd. 1881 p. 331); Sachs (ibid. p. 339); W. Krause (Internation. Monatschr. Anat. Hist. 1. Bd. 1884 p. 200; Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 547); Negro (ibid. 5. Bd. 1888 p. 240); Sihler (Arch. Mikr Anat. 46. Bd. 1895 p. 709; Arch. Anat. Phys. Phys. Abth. f. 1895 p. 202; Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1896 p. 389: neue Art der Färbung mit Hämateïnthonerde); Boccardi (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 492); Kühne (Zeit. Biol. 23. Bd. 1887 p. 1; Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 495: giebt auch einen kritischen Ueberblick über die Goldmethoden); Golgi (Mem. Accad. Torino (2) Tome 32 1880 p. 382); Marshall (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 31 1890 p. 73); Mays (Zeit. Biol. 20. Bd. 1884 p. 449; Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 242).

664. Nervenenden. Ueber **Apáthys** Methoden s. unten § 703 u. 704.

Sehnen.

665. Golgische Körperchen. Ranvier (Traité 1. Ed. p. 929) reinigt die Sehnen an beiden Ansätzen der M. gemini des Kaninchens, so gut es geht, von den Muskeln, behandelt sie dann mit Goldchlorid und Ameisensäure (oben § 371) und schabt nach der Reduktion des Goldes mit einem feinen Messer über sie hin, um die Muskelfasern zu entfernen, die die Körperchen verdecken. — Marchi (Arch. Sc. Med. Torino Vol. 5 No. 15) legt das Auge mit seinen Muskeln auf wenigstens 3 Tage in 2 %ige Lösung von Kaliumbichromat, präparirt die Muskeln und Sehnen sorgfältig ab, färbt sie mit Gold und Osmium nach Golgi oder nach Manfredi (s. oben p. 219), aber nur bei schönem Sonnenschein, zur Untersuchung in Glycerin. — Cattaneo (Arch. Ital.

Biol. Tome 10 1888 p. 337) empfiehlt Gold und Arsensäure nach Golgi (oben p. 219), Ruffini (Atti Accad. Lincei Rend. (5) Vol. 1 1892 Sem. 1 p. 444; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 237) die Methode von Fischer (oben § 370). — Nach Ciaccio (Mem. Accad. Bologna (4) Tome 10 1890 p. 301; Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1891 p. 507) genügt für Amphibien die gewöhnliche Vergoldung nicht, da die Grundsubstanz der Sehne sich genau so färbt wie die Nervenenden. Er legt daher die Sehne in eine $^1/_{10}$ %ige Salzsäure oder $^1/_5$ %ige Essigsäure, bis sie ganz durchsichtig wird, dann auf 5 Minuten in eine Lösung von je 1 g Goldchlorid und Chlorkalium in 1 Liter Wasser, dann wieder zurück in die Essigsäure auf 24 Stunden im Dunkeln und auf 2—4 Stunden in der Sonne. Sind sie dann violett geworden, so legt er sie auf 24 Stunden in eine $^1/_{10}$ %ige Osmiumsäure, endlich in Glycerin, das mit $^1/_2$ %iger Essigsäure oder Ameisensäure versetzt ist.

666. Das **Methylenblau** scheint bisher zum Studium der Nervenenden in den Sehnen noch nicht angewandt worden zu sein, obwohl es sich a priori wohl besonders gut dafür eignet.

Glatte Muskeln.

667. Glatte Muskeln lassen sich nach Retterer (C. R. Soc. Biol. Paris (8) Tome 4 1887 p. 645) folgendermaassen **erkennen.** Fixirt man das Gewebe in einem Gemisch von 10 Vol. 90 %igen Alkohols und 1 Vol. Ameisensäure, wäscht es gut und färbt es 24—36 Stunden lang mit Alaunkarmin, so hat sich das Plasma der glatten Muskeln roth gefärbt, während das Bindegewebe gequollen und ungefärbt ist.

668. Isolirung der Fasern. Schwalbe (Arch. Mikr. Anat. 4. Bd. 1868 p. 394) macerirt die glatten Muskeln in schwacher Chromsäure (gewöhnlich in 0.02 %). Diese ist besser als Osmiumsäure oder 1 %ige Essigsäure (Moleschott), schwache Schwefelsäure, Holzessig (Meissner), 20 %ige Salpetersäure (Reichert) oder endlich 32—35 %ige Kalilauge (Moleschott), da sie die feinere Struktur der Zellen besser erhält.

Schultz (Arch. Anat. Phys. Phys. Abth. f. 1895 1896 p. 521) legt die glatten Muskeln von Wirbelthieren auf 24 Stunden in 10 %ige Salpetersäure, isolirt dann kleinere Stücke davon, spült sie flüchtig mit Wasser ab und bringt sie auf 6—8 Tage (zuerst im Dunkeln) in frische Hertwigsche Osmiumessigsäure ($^1/_{20}$ %ige Osm. und $^1/_5$ %ige Ess. zu gleichen Theilen). Dann werden die Stücke zerzupft und in

verdünntes Glycerin eingeschlossen. Die Innervation hat Schultz mit den bekannten Methoden untersucht.

Die Methoden von Gage s. oben § 518, 529 und 532, die von Möbius (Muskeln von *Cardium*) § 528, die von Ballowitz (Muskeln von Cephalopoden) in: Arch. Mikr. Anat. 39. Bd. 1892 p. 291.

669. Glatte Muskeln von Säugethieren. Werner (Histol. d. glatten Muskulatur Dorpat 1894 p. 22) fixirt die Muskeln des Darmkanales oder der Harnblase gedehnt in Flemmings Gemisch (Formol ist nicht gut) 8—48 Stunden lang, wäscht sie erst in fliessendem, dann in 30° warmem destillirtem Wasser aus und färbt sie hauptsächlich mit Hämatoxylin und Kaliumchromat nach R. Heidenhain. Auch die Versilberung nach Böhm oder Oppel (unten § 749) ist brauchbar, desgleichen zur Darstellung der Intercellularräume die Imbibition mit Oel: frische Darmstücke werden 4 Stunden lang bei 37° C. in Oel gehalten, kommen dann auf 12 Stunden in Flemmings Gemisch und auf 4 bis 6 Stunden in Chromessigsäure.

670. Glatte Muskeln von Würmern. Apáthy (Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 36 und 319) giebt eine ausführliche Darstellung davon, besonders von den optischen Eigenschaften der Fibrillen. Seine Macerationsmethode s. oben § 534.

671. Spezifische Färbung für glatte Muskeln. Unna (Monatsh. Prakt. Dermat. 19. Bd. 1894 p. 533; Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1895 p. 243) färbt Schnitte 10 Minuten lang in polychromem Methylenblau, wäscht sie mit Wasser, fixirt die Farbe durch Behandlung mit einer 1 %igen Lösung von rothem Blutlaugensalz (10 Minuten lang) und differenzirt sie dann durch etwa ebenso langes Einlegen in Alkohol mit 1 % Salzsäure, bis das Collagen weiss wird. Zuletzt absoluter Alkohol, Oel, Balsam. — Unna giebt am gleichen Orte eine Methode zur Färbung mit saurem Orceïn, Hämalaun, Säurefuchsin und Pikrinsäure an.

672. Iris. Dogiel (Arch. Mikr. Anat. 27. Bd. 1886 p. 403) bringt die vordere Hälfte eines Auges mit der Iris auf einige Tage in ein Gemisch von 2 Theilen Drittelalkohol und 1 Theil $^1/_2$ %iger Essigsäure. Dann lässt sich die Iris isoliren und vom Rande her in eine vordere und eine hintere Schicht spalten, die man nach den gewöhnlichen Methoden färbt.

Koganei (Arch. Mikr. Anat. 25. Bd. 1885 p. 1) macerirt die Iris lange Zeit in Müllerschem Gemisch, entfernt dann das Pigmentepithel

mit einem kleinen Pinsel oder bleicht es mit Chlorwasser, das man aber nur einige Stunden lang wirken lassen darf, bis das Pigment hellbraun geworden ist, weil bei längerer Wirkung des Chlors die Gewebe leiden. — S. auch Canfield (Arch. Mikr. Anat. 28. Bd. 1886 p. 121), ferner Dostoiewsky (ibid. p. 91).

673. Regeneration der glatten Muskeln im Magen von *Triton*. Stilling & Pfitzner (Arch. Mikr. Anat. 28. Bd. 1886 p. 396) fixiren den operirten und verheilten Magen durch Einspritzen von und Einlegen in 1/4 %ige Chromsäure, schneiden nach 3—4 Stunden das regenerirte Stück heraus, bringen es auf 1—2 Tage in die Chromsäure zurück, waschen es gut mit Wasser aus, härten es mit Alkohol nach, färben es nach abermaligem Auswaschen in Safranin und bringen es durch Alkohol, Nelkenöl und Xylol in Xylolbalsam. Solche Präparate werden später durch Xylol etc. zurück in Delafields Hämatoxylin gebracht und erhalten nun eine scharfe Kernfärbung, während diese „beim frisch gehärteten Präparat" nicht gelingt.

674. Innervation der Harnblase von *Rana*. Wolff (Arch. Mikr. Anat. 19. Bd. 1881 p. 362) injizirt einem getödteten Frosch eine Lösung von Goldchlorid (1:20000) durch den Anus in die Blase. (Falls sie nach der Wegnahme der Spritze wieder ausfliesst, so binde man dem Frosch die Schenkel zusammen.) Dann öffnet er den Frosch, legt die Blase nach Unterbindung und Freilegung auf 4 Stunden in eine Goldlösung von 1:2000, öffnet sie dann, spannt sie auf Kork, wäscht unter der Wasserleitung das Epithel ab (hierbei wird eventuell mit einem Pinsel nachgeholfen), legt das Präparat auf 24 Stunden in Goldchlorid (1:6000), wäscht es in destill. Wasser aus, stellt es in angesäuertem Wasser auf einige Zeit ins Dunkle und reduzirt das Gold endlich in reinem Wasser am Licht. — Ranvier (Traité 1. Ed. p. 854) empfiehlt seine beiden Goldmethoden (§ 371 u. § 372); die Blase muss aber durch Injektion vom Anus her mit dem Gemisch von Goldchlorid und Citronensaft oder Ameisensäure prall gefüllt sein.

Ueber die Methode der Vergoldung von Bernheim s. oben p. 219. Wahrscheinlich giebt auch die Färbung mit Methylenblau gute Resultate, ist aber, so viel ich weiss, noch nicht ausgeführt worden.

---

28. Kapitel.

Methoden zur Untersuchung der Nerven. Einleitung. Schneiden. Cytologisches.

675. Allgemeines. Die mikroskopische Anatomie des Nervensystems erfordert eine ganz besondere Technik; die gewöhnlichen Methoden reichen zur Erforschung der feineren Struktur der nervösen Elemente und ihrer Verbindungen unter einander nicht aus. Die histologische Erforschung des Nervensytems verfolgt zwei Zwecke: entweder will man den feineren Bau der Elemente, der Neuronen, d. h. der Nervenzellen und Nervenfasern, kennen lernen, und dazu gebraucht man cytologische Methoden; oder man möchte die Form der Nervenzellen, ihre genaue Anordnung in der grauen Hirnmasse und die Verbindungen zwischen den Gruppen der Nervenzellen (den sogenannten Kernen) erforschen und den komplizirten Verlauf der Faserbündel verfolgen, die die weisse Masse des Centralnervensystems zusammensetzen helfen, und dieses sind die anatomischen Methoden in der Neurologie. Letztere aber sind ganz besonders spezialisirt und lassen sich in folgende Gruppen bringen.

A. Methoden für die Nervenfasern.

1. Färbmethoden für das Myelin: die Methoden von Weigert und ähnliche.
2. Färbmethoden für den Axencylinder oder für ihn und das Myelin.

B. Methoden für die Nervenzellen.

3. Färbmethoden für Axencylinder und Protoplasma: die mit Methylenblau und einige ältere Methoden.
4. Imprägnationsmethoden für Axencylinder und Protoplasma: hauptsächlich die Methoden von Golgi (die mit Sublimat und die drei mit Silberbichromat) und einige Vergoldungen.

Bekanntlich existirt keine scharfe Scheidung zwischen dem centralen und dem peripheren Nervensystem, und da nun auch die wichtigsten neurologischen Methoden sich zum Studium des gesammten Nervensystems eignen, so wäre eine formelle Unterscheidung in dieser Richtung hier nicht rathsam. Immerhin sind aber die drei folgenden Kapitel hauptsächlich dem Centralnervensystem gewidmet, indessen nur deswegen, weil viele von den Methoden für das periphere System schon ausführlich in den Kapiteln vom Methylenblau, von den Imprägnationsmethoden, von der Haut und von den Muskeln und Sehnen behandelt worden sind. Auf diese sei also hier ausdrücklich verwiesen. Zunächst seien in diesem Kapitel behandelt die speziellen Methoden zum Schneiden, sowie die cytologischen Methoden; dann folgt im Kapitel 29 die Gruppe A und im Kapitel 30 die Gruppe B der anatomischen Methoden.

Genaueres über das Seciren und Härten so voluminöser Gehirne wie das des Menschen oder grösserer Wirbelthiere überhaupt findet man in Mercier, Les coupes du système nerveux central (Paris 1894); Dejerine, Anatomie des centres nerveux (Paris 1895); B. Lewis, The Human Brain (London 1. Ed. 1882) und Obersteiner, Anleitung zum Studium des Baues der nervösen Centralorgane (2. Aufl. Leipzig 1896).

676. Freilegung des Nervensystems kleinerer Wirbelthiere. Langerhans (Arch. Mikr. Anat. 12 Bd. 1876 p. 291) legt *Amphioxus* auf 3 Tage in 20 %ige Salpetersäure, dann auf 24 Stunden in Wasser und schüttelt ihn zuletzt tüchtig. So lässt sich das ganze Nervensystem fast bis zu den feinsten peripheren Nervenzweigen isoliren. — Schwalbe (Jena. Zeit. Naturw. 13. Bd. 1879 p. 178) verfährt bei der Untersuchung des Ganglion oculomotorii ähnlich mit den frischen Köpfen (oder ganzen Thieren) von *Salamandra* und *Rana*, nur schüttelt er sehr vorsichtig und präparirt die Nerven lieber rein; die Säure verwendet er auf etwa 35° C. erwärmt (2 Tage lang), da sie sonst leicht das Bindegewebe härtet, statt es zu zerstören. Nach kurzer Behandlung mit absol. Alkohol lassen sich die Präparate gut mit Karmin färben.

Zur Verfolgung der Nerven von Fischen giesst Dobberke (Verslag der onderzoekingen [etc.] Zoöl. Station te Napels 1886 p. 3) auf die möglichst freigelegte Stelle des frischen Thieres $\frac{1}{2}$ %ige Essigsäure, wäscht sie nach 1—2 Minuten mit Salzwasser ab, legt nun Filtrirpapier, das mit $\frac{1}{5}$—1 %iger Osmiumsäure getränkt ist, auf und

findet nach 5—10 Minuten die Nerven schwarz auf hellgelbem Grun.
Dickere Stücke behandelt er erst mit 1 % iger Essigsäure, wäscht
gut aus, räuchert sie über 5 % iger Osmiumsäure, bringt endlich du
Essigsäure oder eine konzentrirte Auflösung von Citronensäure
Bindegewebe zum Quellen und präparirt es von den geschwärz
Nerven ab.[1] — Nussbaum (Verh. Anat. Ges. 9. Vers. 1895 p. 2
verfährt ähnlich.

677. Fixiren durch Injektion. Während natürlich von ordentlich
Fixiren des Nervensystems des Menschen nicht die Rede sein kan
lassen sich in das von lebendigen anderen Wirbelthieren die Fixirmi
injiciren, dringen daher rascher ein als bei einfachem Einlegen. Di
Methode hat, glaube ich, zuerst Golgi angegeben (Arch. Ital. Bi
Tome 7 1886 p. 30): er injicirte eine $2^1/_2$ % ige Lösung von Kalium-
bichromat durch die Carotis, wenn er das Gehirn, und durch d
Aorta, wenn er das Rückenmark härten wollte.

Quervain (Arch. Path. Anat. 133. Bd. 1893 p. 489; Zeit. W
Mikr. 10. Bd. 1893 p. 507) verfährt ähnlich, nur lässt er erst das Bl
aus der Carotis ausfliessen und injicirt dann etwa eben so v
warmes Müllersches Gemisch, so bei Hunden 300—600 ccm. b
Katzen nur $^1/_3$—$^1/_2$ davon. Das Gehirn kommt dann auf ein
Wochen bei 37° C. in Müllers Gemisch. — Ueber das Verfahren v
Mann (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 482) s. oben p. 20. — Stro
(Anat. Anzeiger 11. Bd. 1896 p. 655) injicirt ein Gemisch von Formal
und Wasser zu gleichen Theilen durch die Carotis, bis es aus d
Ingularis herausströmt, nach einigen Minuten nochmals, und so n
1 oder 2 Mal. Soll nur nach der Golgischen Methode gearbeit
werden, so nimmt er statt des Wassers eine 10 % ige Lösung v
Kaliumbichromat. Mir erscheint diese ganze Art sehr heroisc
(s. oben p. 53).

Härten.

678. Gefrierenlassen. Wohl nur durch Gefrierenlassen mittels Aeth
lassen sich gute Schnitte durch frisches Nervengewebe erzielen. Die Schnit
behandelt man 1 Minute lang auf dem Objektträger mit $^1/_4$ % Osmiumsäur
(Näheres s. in Lewis, The Human Brain.) — Goodall (Brit. Med. Journ. 189

[1]) Die Methode rührt von mir her: ich habe damit die Flossennerven v
Selachiern präparirt (Mitth. Z. Stat. Neapel 6. Bd. 1886 p. 234). Essig- od
Citronensäure haben mir auch zum bequemen Verfolgen feiner Gefässe, die m
Berlinerblau injizirt waren, gedient (ibid. 8. Bd. 1888 p. 313). [M.]

p. 947; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1893 p. 405) schneidet gefrorenes Rückenmark, lässt die Schnitte auf Wasser schwimmen, nimmt sie rasch heraus, saugt das Wasser ab und bringt sie auf Pyridin, wäscht sie $^1/_4$—1 Stunde später mit Wasser, färbt sie in einer $^1/_4$%igen Lösung von Anilin blue-black, dann mit Pikrokarmin, entwässert sie in Pyridin und schliesst sie in Pyridinbalsam ein. (S. auch § 107.)

679. Härten in Reagentien. Allgemeines. Falls grosse Stücke zu härten sind, so schneide man sie in Scheiben von nur wenigen Millimetern Dicke, lege sie auf Watte in ein Gefäss und giesse das Härtmittel darauf; so kann dieses von allen Seiten herandringen, und die Watte verhindert zugleich durch ihre Elastizität, dass die Scheiben durch ihr eigenes Gewicht sich werfen. Auch kann man die Stücke in oder auf der Watte dicht unter der Oeffnung eines Cylinderglases aufhängen, um die Diffusion des Fixirmittels noch mehr zu erleichtern. Jedenfalls dürfen die Stücke einander nicht bedecken. Will man das Objekt nicht in Scheiben zerlegen, so schneide man es wenigstens in den gleichgültigeren Theilen tief an. Am besten entfernt man zunächst wohl nur die Dura und erst später, wenn die Härtung schon fortgeschritten ist, auch die anderen Häute theilweise oder ganz. Das Rückenmark, verlängerte Mark und die Varolsbrücke kann man in toto härten, und zwar entfernt man die Dura sofort und hängt das Präparat in einem Cylinder auf, befestigt auch unten ein Gewicht daran, damit es nicht auf dem Härtgemisch (z. B. Müllers Gemisch) schwimme und sich nicht durch die elastischen Fasern in der Pia und und Arachnoidea krümme. Das Hirn legt man auf die Watte oder hängt es darin eingehüllt auf, bringt auch Bäusche in die Windungen, so weit das geht, und schneidet es sagittal durch. Betz empfiehlt, schon nach einigen Stunden die Pia und die Choroidealplexus zu entfernen, jedoch erfordert das, scheint mir, eine geübte Hand.

Die Härtung wird durch erhöhte Temperatur meist sehr beschleunigt. So werden nach Weigert (Centralbl. Med. Wiss. 20. Jahrg. 1882 p. 819; Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 388) bei 39—40 ° C. die Präparate in Müllers Gemisch schon in 8—10 Tagen und in Erlickis Gemisch schon in 4 Tagen gut, jedoch ist es keineswegs sicher, dass das Schnellhärten auch die besten Resultate liefert. Nach Sahli (Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 3) ist das bei den Chromaten nicht der Fall und sollte daher nicht mehr geschehen. Andererseits wirken bei gewöhnlicher Temperatur die Chromate so langsam, dass die Gewebe sich bereits ein wenig zersetzen mögen, ehe noch das Härtmittel seine

Schuldigkeit thun kann. Will man daher voluminöse Objekte langsam härten, so sollte man sie jedenfalls kühl stellen, am besten in einem Eisschrank.

680. Die Härtmittel. Von der Chromsäure ist man jetzt ziemlich zurückgekommen, da sie zwar rascher, aber auch ungleichmässiger wirkt als die chromsauren Salze, auch häufig die Gewebe brüchig macht. Die Osmiumsäure kann leider nur bei Stücken von höchstens 1 ccm Grösse verwandt werden, so vorzüglich sie auch sonst ist. Das Gemisch von Erlicki wirkt zwar rascher, als die anderen Chromverbindungen, jedoch kommt Sahli (l. c.) nach vergleichenden Studien zum Schlusse, dass man am besten mit reinem Kaliumbichromat (3—4 %ige Lösung) in der Kälte härtet. Ebenso Obersteiner, der allerdings für die feinsten Einzelheiten empfiehlt, in Fols Gemisch (oben p. 32) 24 Stunden lang zu fixiren, dann mit Wasser auszuwaschen und in 80 %igem Alkohol zu härten.

Da die chromsauren Salze so langsam eindringen, so behandelt man oft zweckmässig die Objekte zuerst 24 oder mehr Stunden lang mit 80—90 %igem Alkohol und legt sie dann erst in das Härtgemisch.

Nach Fish (The Wilder Quarter Century Book 1893 p. 335) und Donaldson (Journ. Morph. Boston Vol. 9 1894 p. 123) nimmt das Gehirn von *Ovis* in Kaliumbichromat an Gewicht und Volumen zu, in allen anderen Härtmitteln hingegen ab.

Ueber das Formaldehyd liegen wohl noch nicht Erfahrungen genug vor. S. hierüber oben § 90 u. § 109 sowie unten § 685 u. 750. Nach Flatau (Anat. Anzeiger 13. Bd. 1897 p. 323) nimmt in 10%iger Formollösung das Gehirn nur ganz unwesentlich an Gewicht zu (das Rückenmark bis zu 14%), in 1%iger dagegen bis zu 23%.

681. Stärke der Härtgemische. Mit Ausnahme der Osmiumsäure sollte man alle Gemische zunächst so schwach nehmen, wie sich mit der Konservirung des Gewebes verträgt, und dann allmählich verstärken. Osmiumsäure von 1 % härtet nach Exner kleine Stücke in 5—10 Tagen. Bei Kaliumbichromat beginnt man mit einer 2 %igen Lösung und bringt sie für Rückenmark und Grosshirn auf 3—4, für das Kleinhirn auf 5 %. Obersteiner fängt mit 1 % an und steigt in 6—8 Wochen langsam auf 2—3 % (bei gewöhnlicher Temperatur, bei 35—45 ° C. hingegen in 1—2 Wochen). Von Ammoniumbichromat nimmt man zuerst nur die halbe Stärke des Kalisalzes oder noch weniger und steigt für das Kleinhirn bis zu 5 %.

Die Chromsäure wird nur selten allein benutzt (oben § 92), wohl aber in den unten zu erwähnenden Gemischen und beschleunigt, in ganz geringen

Dosen (1—2 Tropfen einer 1%igen Lösung auf 30 g) dem Kaliumbichromat zugesetzt, die Härtung, ohne zu schaden. 10—12%ige Salpetersäure giebt besonders zähe Präparate. Neutrales Bleiacetat in 10%iger Lösung konservirt nach Kotlarewski (Mitth. Nat. Ges. Bern f. 1887 1888 p. 17; Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 387) die Ganglienzellen ausgezeichnet. Trzebinski (Arch. Path. Anat. 107. Bd. 1887 p. 1; Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 497) hat die Ganglienzellen im Rückenmark von *Canis* und *Lepus* am besten durch 8 tägige Härtung in konzentrirter Sublimatlösung und nachträgliche Behandlung mit 1/8%iger alkoholischer Jodlösung erhalten. Aehnlich Diomidoff (ibid. p. 499): er härtet kleine Stücke vom Gehirn 5—9 Tage in Sublimat, legt sie dann auf je 24 Stunden in Alkohol von 50, von 70 und von 96%. Ohlmachers Vorschrift s. unten § 893, über Chlorzink unten § 684 u. 685.

682. Härtung nach Betz (Arch. Mikr. Anat. 9. Bd. 1873 p. 101). Sie besteht im Wesentlichen darin, dass man das Mark nach Abpräparirung der Dura in einem Cylinder mit 75—80%igem Alkohol, der durch Jod hellbraun gemacht ist, aufhängt, dann nach 1—3 Tagen auch die beiden anderen Häute entfernt und unter stetem Ersatz des absorbirten Jods die Objekte noch etwa 6 Tage im Alkohol lässt, um sie schliesslich in 3%igem Kaliumbichromat an einem kühlen Orte so lange zu härten, bis sich auf ihnen ein brauner Niederschlag absetzt. Nun werden sie mit Wasser gewaschen und in 1/2—1%igem Kaliumbichromat aufgehoben. Das Kleinhirn legt man auf Watte und behandelt es ähnlich (Genaueres s. im Original), verwendet aber das Bichromat in 5%iger Lösung. Das Grosshirn halbirt man sagittal und härtet es zuletzt in einer 4%igen Lösung.

683. Härtung des Grosshirns nach Lewis (Human Brain p. 102). Man legt es im Kühlen auf 24 Stunden in Alkohol von 90%, dann in Müllers Gemisch, wechselt die Flüssigkeit nach 3 Tagen, darauf nach 6 Tagen nochmals, oder ersetzt sie besser durch eine 2%ige Lösung von Kaliumbichromat. Am Ende der zweiten Woche setzt man eine 4%ige Lösung zu, und wenn noch eine Woche später das Hirn sich nicht schneiden lassen will, so legt man es in eine Lösung von Chromsäure.

684. Härtung des Hirns. Hamilton (Journ. Anat. Phys. London Vol. 12 1878 p. 254) legt Scheiben des Grosshirns auf Watte in ein abgekühltes Gemisch von 3 Theilen Müllerschem Gemisch und 1 Theil Alkohol von 90%, setzt das Gefäss in einen Eisschrank, dreht die Scheiben am folgenden Tage um, wechselt die Lösung nach 2—3 Wochen und bringt die Scheiben entweder dann oder schon früher, sobald

das Gemisch gut eingedrungen ist, in eine Lösung von Ammoniumbichromat (1:400), die nach je 1 Woche durch eine 1 % ige und 2 % ige ersetzt wird. Definitive Aufbewahrung in einer Lösung von Chloralhydrat (1:40).

Deecke (Journ. R. Micr. Soc. London (2) Vol. 3 1883 p. 449) härtet das Hirn in $^1/_2$—1 % iger Lösung von Ammoniumbichromat.

Duval (Journ. Anat. Phys. Paris Tome 12 1876 p. 497) legt das Hirn in eine $2^1/_2$ % ige Lösung von Ammoniumbichromat, wechselt diese nach 1 Tage und nochmals nach 3—4 Tagen, ersetzt sie dann nach 2—3 Wochen durch schwache Chromsäure (3:1000) und wechselt diese die 1. Woche lang alle Tage, dann aber bis zur Mitte des 2. Monats alle 8 Tage. Das Hirn muss wenigstens 2 Monate in der Flüssigkeit bleiben, der man übrigens gegen das Schimmeln etwas Kampher zusetzt.

Fish (Wilder Quarter Cent. Book 1893 p. 393) legt das Hirn auf etwa 3 Tage in ein Gemisch von Wasser und 95 % igem Alkohol je 400 ccm. Glycerin 250 ccm, Chlorzink und Chlornatrium je 20 g; wenn es geht injicirt er auch die Gefässe damit; dann bringt er es auf 1 Woche oder länger in ein Gemisch der obigen Flüssigkeit und von 70 % igem Alkohol zu gleichen Theilen, und zum Schluss in 90 % igen Alkohol.

685. Härtung des Hirns in Formaldehyd. S. hierüber oben § 109 u. 680 sowie unten § 750. Weigert (Abh. Senckenberg. Ges. Frankfurt 19. Bd. 1895 p. 199) legt Stücke von nicht über 5 mm Dicke auf 4 Tage in Formol 1:10. — Marcus (Neur. Centralbl. 14. Jahrg. 1895 p. 4; Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 241) härtet Rückenmark 2—4 Wochen lang in $^1/_2$ % igem Formalin, schneidet dann Stücke von 5 mm Dicke heraus und legt sie auf 1 Woche bei 37° C. in Müllers Gemisch, dann in 95 % igen und absoluten Alkohol, um sie in Celloidin zu schneiden. — van Gieson (Anat. Anzeiger 10. Bd. 1895 p. 494) hat mit gutem Erfolg „4, 6 und 10 % iges Formalin" und darauf 95 % igen Alkohol benutzt. Das Myelin hält sich darin gut und giebt auch die blaue Reaktion mit Hämatoxylin nach Weigert (unten § 707). — Lachi (Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1895 p. 32) hat ebenfalls gute Resultate mit „20 % igem Formol" erzielt.

Fish (Trans. Amer. Micr. Soc. Vol. 17 1896 p. 319) empfiehlt folgendes Gemisch: Wasser 2000, Formalin 50 ccm, Chlornatrium 100, Chlorzink 15 g. Ein Gehirn lässt man darin 8—10 Tage oder noch länger und bewahrt es dann in $2^1/_2$ % igem Formalin in einem gut

geschlossenen Gefässe auf. Ein Menschenhirn verlor darin nach 14 Tagen nur 6,8 % an Gewicht, während ein anderes nach 1 Woche in 50 % igem und 1 Woche in 70 % igem Alkohol 22 % einbüsste.

Nach Parker & Floyd (Anat. Anzeiger 11. Bd. 1895 p. 156) härtet ein Gemisch von 1 Vol. Formol und 49 Vol. Wasser ein Schafshirn in 7—10 Tagen vollständig, vermehrt aber dessen Volumen bis um 40 %. Daher setzt man besser zu 2 Vol. des obigen Gemisches 3 Vol. Alkohol von 95 %; das Hirn wird darin eben so rasch gut, nimmt aber an Umfang kaum zu und kann Monate lang darin bleiben (ibid. 1896 p. 568).

Marina (Riv. Pat. Nerv. Ment. Firenze Vol. 2 1897 p. 20; Neur. Centralbl. 16. Jahrg. 1897 p. 166) fixirt Stücke vom Centralnervensystem 4—8 Tage lang in einem frischen Gemisch von 100 ccm 90 %igem Alkohol, 5 ccm Formol und 0,1 g Chromsäure, wechselt das Gemisch täglich, wäscht sie dann mit 45 %igem Alkohol aus und schneidet sie ohne Einbettung unter 90 %igem. Die Schnitte lassen sich eben so gut nach Nissl wie nach Held oder Weigert färben.

Gerota (Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 314) bringt das Gehirn von *Homo* in eine 5—10 % ige wässerige Lösung von Formol, zieht nach 24 Stunden die Pia ab, ersetzt die Flüssigkeit durch neue und so noch alle 5—7 Tage; in 1—2 Wochen ist die Härtung beendet. Handelt es sich um embryonale Gehirne von *Canis, Felis* und *Homo,* so injicirt er (p. 315) zuerst das Gefässsystem mit einer 10—15 % igen Lösung von Formol in 85 % igem Alkohol und bringt dann den Kopf in die obige 5—10 % ige Lösung; nach 1—2 Tagen nimmt er das Hirn aus dem Schädel heraus und legt es von Neuem auf 15—20 Tage in die Lösung.

686. Für das **Kleinhirn** von *Canis* empfiehlt Berkley (J. Hopkins Hosp. Rep. Vol. 3 1893 p. 195; Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 388) das Einlegen in Flemmings Gemisch auf 24—36 Stunden, dann absoluten Alkohol und Celloidin.

687. Nervensystem von niederen Wirbelthieren. Mason (Whitman, Methods p. 196) nimmt für Amphibien und Reptilien Jodalkohol 6—12 Stunden lang, dann eine 3 % ige Lösung von Kaliumbichromat (mit etwas Kampher darauf) 6—10 Wochen lang, erneuert diese aber alle 14 Tage.

Burckhardt (Centralnerv. *Protopterus* Berlin 1892; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1893 p. 347) härtet das Hirn von *P.* in 1—2 Tagen durch ein Gemisch von 1 Theil Salpetersäure, 1 Theil 2 % iger Osmiumsäure und 30 Theilen 1 % iger Chromsäure.

Fish (Journ. Morph. Boston Vol. 10 1895 p. 234) fixirt das Hirn von *Desmognathus* 12—24 Stunden lang in 100 ccm 50 %igem Alkohol mit 5 ccm Eisessig, 5 g Sublimat und 1 g Pikrinsäure.

Einbetten und Schneiden.

688. Einbetten. In Paraffin lassen sich sehr grosse Objekte nur mit viel Aufwand an Zeit und Mühe einbetten. Das Rückenmark des Menschen steht schon für gewöhnliche Forscher an der Grenze: es lässt sich natürlich noch gut damit durchtränken, wenn man es vorher in Scheiben von höchstens einigen Millimetern — am besten nur 1 mm — Dicke schneidet. Ganze Menschenhirne wirklich gut in Paraffin einzubetten, scheint noch nicht gelungen zu sein, selbst Strasser nicht, der doch eigene Methoden für aussergewöhnlich umfangreiche Objekte ausgedacht hat (s. § 689); man begnügt sich daher wohl mit der Anbringung eines Mantels von Paraffin um das Gehirn, der allerdings hier sehr gute Dienste leistet. Mittelgrosse Objekte sollte man ohne Bedenken in Kollodium bringen, was die sicherste, bequemste und auch für die Behandlung der Schnitte vortheilhafteste Art der Einbettung ist.

Wirkliches Einbetten ist nicht absolut nöthig, nur muss das Material dann sehr gut gehärtet sein. Man klebt ein passendes Stück davon mit dicker Gummilösung auf Holz oder Kork, legt es, sobald es anklebt, in Alkohol von 80 %, um das Gummi zu härten, spannt es in das Mikrotom ein und schneidet es.

Beim Kollodium kann es vorkommen, dass es die Gewebe nicht ordentlich durchtränkt hat. Immerhin erhält man noch gute Schnitte, wenn man (nach Duval) die Schnittfläche des Stückes durch Blasen darauf trocken legt, dann mit einem Pinsel eine dünne Schicht Kollodium darauf streicht und, so wie dies etwas angetrocknet ist, den Schnitt macht. Auch bei gut eingebettetem Material greift man mit Vortheil zu dieser Methode, da sie dem Gewebe eine bessere Konsistenz verleiht, sodass man dünnere Schnitte machen kann (van Gehuchten in litt.).

Als Marke zum Orientiren eines zu schneidenden Rückenmarks lehnt Fish (Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1892 p. 492) ein Stäbchen gehärteter Leber von etwa 1 Quadratmillimeter Breite an die Stelle, die er kennzeichnen will, und bettet es mit ein.

689. Methoden von Strasser für sehr grosse Schnitte. Strasser (Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 8) kann mit seinem Schnitt-Aufklebe-

Mikrotom Objekte von 10 cm Breite, 15 cm Länge und 6 cm Dicke schneiden. Er legt nun (ibid. 12. Bd. 1895 p. 160) in das Fixirgemisch (Formalin oder dieses und Chromatlösung) das Gehirn entweder in toto, oder in Scheiben von 3—4 cm Dicke geschnitten, ein und schneidet erst nach der Härtung in Alkohol Scheiben von 1—2 cm Dicke heraus, um diese einzubetten. Sollen sie in Paraffin kommen, so legt er sie erst in Karbolxylol (s. § 164), lässt dieses abdunsten, bringt sie dann in gelbes Vaselin und zum Schluss in ein Gemisch von Paraffin (42° Schmelzpunkt) und Vaselin oder in reines Paraffin, je nach der Grösse. Die in Celloidin eingebetteten Scheiben durchtränkt er vor dem Schneiden mit einer Mischung von Karbolxylol und 80 % igem Alkohol zu gleichen Theilen.

Cytologisches.

690. Allgemeines. So weit beim Studium des Nervensystems die allgemeinen Principien der Untersuchung der Zelle zur Anwendung kommen, sei hier auf Kapitel 25 verwiesen. Die folgenden §§ behandeln spezielle Fälle.

a) Nervenzellen.

691. Färben mit Methylenblau nach Nissl (Centralbl. Nervenheilk. Psych. 17. Bd. 1894 p. 337; Neur. Centralbl. 13. Jahrg. 1894 p. 781; Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1895 p. 79; ibid. 13. Bd. 1896 p. 237). Frisches Material wird in Alkohol von 90 % gehärtet und uneingebettet geschnitten. Die Schnitte kommen in einem Uhrglase in eine Lösung von 15 Theilen Methylenblau und 7 Theilen venetian. Seife in 4000 Theilen Wasser, das auf 65—70° C. erwärmt wird, bis Dämpfe aufsteigen, dann zur Differenzirung in ein Gemisch von 1 Theil wasserhellem Anilin und 9 Theilen Alkohol von 96 %. Verlieren sie keine Farbe mehr, so werden sie auf dem Objektträger mit Påpier abgetrocknet, mit Cajeputöl durchtränkt, wieder abgetrocknet, mit einigen Tropfen Benzin behandelt und in Benzinkolophonium (§ 441) so lange erhitzt, bis alles Benzin verdampft ist.

van Gehuchten theilt mir eine einfachere Methode mit. Die mit Wasser aufgeklebten Paraffinschnitte werden in Nissls Gemisch 5 bis 6 Stunden lang bei 35—40° C. gefärbt, nach Nissl differenzirt und in Xyloldammar eingeschlossen.

Die ältere Methode von Nissl zum Färben mit Dahlia, Fuchsin oder Vesuvin ist kurz angegeben im Tagebl. 58. Vers. D. Naturf. Aerzte 1885 p. 506.

Sadovsky (C. R. Soc. Biol. Paris (10) Tome 3 1896 p. 353) fixirt kl- Stücke von Menschenhirn (etwa ½ ccm gross) 3–4 Tage lang in „solution aqueuse de Formol à 10 p. 100“, bringt sie direkt auf 2 Tage Alkohol von 96%, dann auf 3 Tage in absoluten, bettet sie in Celloidin und färbt die Schnitte, da er die Methode von Nissl für zu komplizirt launisch hält, mit Methylenblau oder Fuchsin in folgender einfacher Weise. In der 1%igen Lösung von Methylenblau verweilen die Schnitte ¼ Stunde bis mehreren Stunden, in der konzentr. Lösung des Fuchsins in Karbolwasser (5:100) nur ½–3 Minuten; in beiden Fällen werden sie auf dem Objektträger mit 1%iger Essigsäure so lange behandelt, bis die graue und weisse Substanz deutlich hervortreten, dann in absol. Alkohol völlig differenzirt und durch Xylol in Balsam gebracht. Das Fuchsin färbt schärfer als das Methylenblau.

Ilberg (Neur. Centralbl. 15. Jahrg. 1896 No. 18) färbt die Hirne kleiner Thiere oder Stücke der Hirne grösserer Thiere im Methylenblau von Nissl 5–10 Tage lang, wäscht sie 2–3 Tage in 96%igem Alkohol aus, bettet sie in Paraffin ein, bringt die nicht aufgeklebten Schnitte durch Xylol in Alkohol von 96% und, falls sie sich darin nicht genug differenziren, in das Anilingemisch, von da in absol. Alkohol, Xylol und Xylolbalsam. Das Anbrennen nach Nissl ist unnöthig.

692. Färben mit Methylenblau und Eosin. Eve (Journ. Phys. Cambridge Vol. 20 1896 p. 341) fixirt die sympathischen Ganglien von *Lepus* 4–16 Stunden lang in Sublimat, wäscht sie einige Stunden in Wasser, mehrere Tage in immer stärkerem Alkohol, bettet sie durch Cedernöl in Paraffin (55° Schmelzp.) ein und färbt die mit Wasser aufgeklebten Schnitte 24 Stunden lang in einem Gemisch von 50 ccm konzentr. wässeriger Lösung von Methylenblau, 5 g Eosin, 70 ccm Alkohol [von 90%?] und 130 ccm Wasser, wäscht sie mit absol. Alkohol ganz hell und bringt sie durch Toluol in Balsam. (Zur Kernfärbung verwendet er Pikrokarmin und nachher Methylenblau.)

693. Färben mit Methylenblau und Erythrosin. Held (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. f. 1895 1896 p. 399) färbt aufgeklebte Paraffinschnitte durch Hirn von Säugern zuerst unter leichtem Erwärmen 1–2 Minuten lang in Erythrosin (1 g des von Grübler bezogenen Salzes auf 150 g destill. Wasser und 2 Tropfen Eisessig), wäscht mit Wasser aus, färbt mit Methylenblau (gleiche Theile des Nisslschen Gemisches und einer 5%igen Acetonlösung) unter starkem Erwärmen so lange nach, bis der Geruch nach Aceton vergangen ist, lässt den Objektträger erkalten und differenzirt mit Alaunlösung (1:1000), bis die Schnitte wieder röthlich erscheinen, spült in Wasser ab, entwässert möglichst rasch in absol. Alkohol und schliesst durch Xylol in Benzinkolophonium ein. Je nach der Konservirung des Hirns (in

96 $^{0}/_{0}$igem Alkohol, Pikrinschwefelsäure, Chromsäure etc.) fallen die Bilder ganz verschieden aus, da die sogen. Nisslschen Körper in der lebenden Zelle nur als Stoffe vorhanden sind, die von den Fixirmitteln mehr oder weniger körnig ausgefällt werden. — Ueber leichte Aenderungen in dieser Methode sowie über Methoden zur Fixirung des feineren Baues der Nervenzellen von Wirbelthieren s. Held in: Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. 1897 p. 226—233.

694. Färben mit Thionin. Lenhossék (Fein. Bau d. Nervensystems 2. Aufl. Berlin 1894 p. 149) fixirt die Stücke 2 Tage lang in 50 $^{0}/_{0}$igem Formol, legt sie dann auf ebenso lange in absol. Alkohol, bettet sie in Celloidin oder Paraffin ein, färbt die Schnitte 5 Minuten lang in einer konzentr. wässerigen Lösung von Thionin, spült sie mit Wasser ab, differenzirt sie im Gemisch von absol. Alkohol (9 Theile) und Anilin (1 Theil) und führt sie durch Cajeputöl und Xylol in Dammar oder Balsam über. Die Färbung ist nicht haltbar.

695. Färben mit Indoinblau oder Methylenblau. Cox (Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 498) fixirt die Spinalganglien zur Demonstration des fibrillären Baues ihrer Zellen 2—3 Tage lang in einem Gemisch von entweder 30 Th. gesättigter Sublimatlösung, 10 Th. 1 $^{0}/_{0}$iger Osmiumsäure und 5 Th. Eisessig, oder 15 Th. gesätt. Subl., 10 Th. 1 $^{0}/_{0}$iger Osm., 5 Th. Eisessig und 15 Th. 5 $^{0}/_{0}$iger Lösung von Platinchlorid, bringt die aufgeklebten Paraffinschnitte auf 8 Stunden in eine 20—25 $^{0}/_{0}$ige Tanninlösung, wäscht sie und beizt sie entweder mit Brechweinstein, um sie mit Indoinblau und Alaun zu färben, oder mit Eisenammoniumsulfat, um sie mit Methylenblau und Kaliumkarbonat zu färben.

696. **Rosin** (Neur. Centralbl. 12. Jahrg. 1893 p. 1; Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1895 p. 77) färbt mit dem Gemisch von Ehrlich-Biondi.

697. Die **Methoden von Rehm** (Münchener Med. Woch. 39. Jahrg. 1892 p. 217; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1893 p. 390) sind wie folgt. Die Schnitte werden einige Minuten lang in konzentr. wässeriger Lösung von Congoroth gefärbt, in Alkohol gewaschen und 10 Minuten lang mit saurem Alkohol (Salzsäure oder Salpetersäure) behandelt, bis sie blau werden, dann durch Origanumöl in Balsam gebracht. Einfacher aber färbt man die Schnitte von Material aus Alkohol 1—2 Tage lang in einer wässerigen $^{1}/_{2}$ $^{0}/_{0}$igen Lösung von Hämatoxylin, wäscht sie mit einer Lösung von Lithiumkarbonat, bis sie keine Farbe mehr abgeben, entwässert sie und legt sie in Balsam. Auch können sie mit einer $^{1}/_{10}$ $^{0}/_{0}$igen wässerigen Lösung von Bismarckbraun einige Minuten lang nachgefärbt werden. (Die anderen Methoden von Rehm s. unten § 732 u. 733.)

698. Färbung der Mitosen nach Weigert (Allg. Zeit. Psychiatrie 50. Bd. 1894 p. 245). Schnitte durch Material, das in 96 $^{0}/_{0}$igem

Alkohol fixirt und ohne Einbettung geschnitten worden ist, legt man auf 1/2 Stunde in Tinct. Ferri acet. Rademacheri, spült sie in Wasser ab, bringt sie auf 1/2 Stunde in Weigerts Hämatoxylinlösung (1 g Häm., 10 ccm Alkohol, 100 ccm Wasser), spült sie wieder ab, differenzirt sie rasch in saurem 70 %igem Alkohol (1 % Salzsäure), spült sie nochmals ab und schliesst sie entwässert in Balsam ein.

b) Nervenfasern.

699. Struktur der markhaltigen Fasern. Zur Demonstration des Axencylinders und der Schwannschen Scheide kann man das Myelin entfernen, und zwar entweder durch Kochen der Fasern mit Natronlauge (und Neutralisiren) oder mit einem Gemisch von Aether und absolutem Alkohol unter Zusatz von etwas Aetznatron, oder mit Eisessig oder mit rauchender Salpetersäure (und Neutralisiren); oder (nach Kuhnt in: Arch. Mikr. Anat. 13. Bd. 1877 p. 442) durch Behandeln mit Eau de Javelle, mit 36 %iger Salpetersäure oder mit schwachem Ammoniak; oder (nach van Gehuchten in litt.) einfach durch längeres Einlegen in Alkohol und Aether.

700. Axencylinder. Kupffer (Sitz. Ber. Akad. München 13. Bd. 1884 p. 470; Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 106) befestigt einen Nerven gedehnt auf Kork, behandelt ihn 24 Stunden lang mit 1/2 %iger Osmiumsäure, wäscht ihn 2 Stunden lang mit Wasser, färbt ihn 24—28 Stunden lang mit gesättigter Lösung von Säurefuchsin, wäscht ihn 6 bis höchstens 12 Stunden lang mit absolutem Alkohol, bringt ihn durch Nelkenöl in Paraffin und erhält dann auf den Schnitten den Axencylinder als ein Bündel rother Fibrillen. — S. auch § 900.

701. Neurokeratin. Färbung nach Galli (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 467) mit Chinablau, nach Platner (ibid. 6. Bd. 1889 p. 186) mit Echtgrün (Dinitrosoresorcin; Fixirung der Nerven mit Eisenchlorid; s. auch Beer in: Jahrb. Psychiatrie 11. Bd. 1893 1. Heft). Darstellung durch Verdauen nach Gedoelst (La Cellule Tome 3 1887 p. 117, Tome 5 1889 p. 126; Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 57).

702. Andere Methoden für markhaltige Nerven. Ranvier, Traité 1. Ed. p. 718 ff.; Rezzonico (Arch. Sc. Med. Torino 1879 p. 237); Tizzoni (ibid. 1878 p. 4: Kochen in Chloroform, Färben, Einlegen in Glycerin); Boveri (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 91); Jakimovitch (Journ. Anat. Phys. Paris 23. Année 1888 p. 142; Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 526: imprägnirt den Axencylinder mit Höllenstein und reduzirt in Ameisensäure und Amylalkohol, s. § 360); Schiefferdecker (Behrens, Kossel & Schiefferdecker, Mikroskop, 2. Bd. p. 227); Huber (Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 394: Safranin und Lichtgrün nach Benda); H. Rabl (ibid. 11. Bd. 1894 p. 42: die Frommannschen Linien sind Artefakte);

Fischel (ibid. p. 48: Resultat ähnlich); Tirelli (ibid. 11. Bd. 1894 p. 391); Segall (Journ. Anat. Phys. Paris 29. Année 1893 p. 586); Marchesini (Anat. Anzeiger 12. Bd. 1896 p. 211: Sublimat und Schwefelkalium).

c) Nervenzellen und Nervenfasern.

703. Färbung der Neurofibrillen mit Hämateïnthonerde nach Apáthy (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1897 p. 712). Die Objekte (beliebige Thiere, also auch wirbellose) können mit irgend welchen Fixirgemischen behandelt worden sein (nur nicht heiss!), also mit Sublimat, Sublimat-Essigsäure etc., Zenkerschem Gemisch, Pikrinschwefelsäure u. s. w., falls diese eine gute Färbung mit Hämateïnthonerde nicht unmöglich machen. Aufbewahrt müssen sie in 90 %igem Alkohol werden. Zum Durchfärben dürfen die Stücke nicht dicker als 5 mm sein. Sie kommen nun auf mindestens 48 Stunden (selten auf länger als 72) in die Hämateïnlösung IA (oben § 256), werden dann in absolut reinem destillirtem Wasser, das man öfter erneuert, bis zu 24 Stunden lang ausgewaschen, wobei man sie am besten im Wasser aufhängt. Die Dauer des Waschens variirt und muss für jedes Objekt ausprobirt werden. Ehe nun auch aus den Neurofibrillen die Farbe entweicht, fixirt man sie durch Einlegen des Stückes in Brunnenwasser auf 3—5 Stunden, bringt die Objekte auf höchstens 2 Stunden in destillirtes Wasser zurück, entwässert sie sofort möglichst rasch, indem man sie in recht viel absolutem Alkohol aufhängt, und bettet sie ebenfalls schleunigst in Paraffin (durch Chloroform) oder Celloidin oder Glycerinleim ein (oben § 148); hierbei muss man die Objekte, während sie in Chloroform oder den Celloidinlösungen sind, vor dem Licht schützen. Will man die Objekte in Celloidin nicht sofort schneiden, so hebt man sie in Glycerinleim auf, wie bei der Goldmethode (unten p. 332). Die Schnitte bringt man in ein Harz oder in neutrales Glycerin.

704. Nachvergoldung der Neurofibrillen nach Apáthy (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1897 p. 729). Die Gewebe von Wirbellosen werden in Sublimat (konzentrirter Lösung in $^1/_2$ %igem Salzwasser) oder Sublimatalkohol (§ 61) höchstens 12 Stunden lang fixirt, die von Wirbelthieren hingegen (nur 1 mm dicke Stücke!) in einem Gemische gleicher Theile Sublimat (in $^1/_2$ %igem Salzwasser) und 1 %iger Osmiumsäure, das aber erst vor dem Gebrauch hergestellt wird. (Damit die Osmiumsäure nicht zu stark schwärze, müssen alle Operationen

mit den Objekten bis zum Einbetten in Paraffin bei sorgfältigem Abschluss des Lichtes geschehen.) Dann werden sie mit wässeriger Lösung von Jodjodkalium 6—8 Stunden lang ausgewaschen, in 95 %igen Alkohol bis über Nacht gelegt, nochmals mit Jodjodkalium (½ % J und 1 % KJ im Alkohol) behandelt und entweder durch Chloroform (oder Chloroform 4 Theile und Aether 1 Theil, nicht durch Xylol) in Paraffin oder in Celloidin eingebettet. Die aufgeklebten Paraffinschnitte bringt man durch Chloroform etc., die Celloidinschnitte durch Bergamottöl etc. (§ 205) auf 2—6 Stunden in destillirtes Wasser (oder nach dem Abspülen mit Wasser auf 1 Minute in 1 %ige Ameisensäure und nach nochmaligem Abspülen in das Goldbad), dann auf 24 Stunden, mindestens über Nacht, in das 1 %ige Goldbad (§ 377), taucht sie kurz in destillirtes Wasser oder wischt die Goldlösung mit Filtrirpapier vom Objektträger ab und stellt nun jeden Objektträger für sich in einem Tubus voll 1 %iger Ameisensäure schräg so auf, dass die Schnitte (am besten von 7—10 μ) nach unten schauen, damit sich nicht etwa Gold auf ihnen niederschlagen kann. Nach der Belichtung Färben (der Kerne etc.) und Einschliessen beliebig.

Es ist durchaus nöthig, alle Operationen bis zum Einbetten möglichst rasch zu machen. In Paraffin halten sich die zu vergoldenden Objekte unbegrenzt lange, in Celloidin jedoch nur dann, wenn man den Block in Glyceringelatine aufhebt, auf die man etwas Thymol (gegen den Schimmel) legt; will man dann schneiden, so erwärmt man die Gelatine gelinde, nimmt den Block heraus, wäscht ihn mit lauem Wasser ab und schneidet ihn sofort, wobei man das Messer mit 95 %igem Alkohol benetzt hält.

S. im Uebrigen oben § 376 und 377, wo auch die Vorvergoldung erörtert ist, und unten § 901.

705. Färben mit Hämateïnkupfer. Viallanes (Ann. Sc. N. (7) Tome 13 1892 p. 354) fixirt die Augen von *Palinurus* in Sublimat und Essigsäure (Subl. 5, Ess. 5, Wasser 100), bringt sie direkt in Alkohol von 70 %, entpigmentirt sie in einem Gemisch gleicher Theile von absolutem Alkohol, Glycerin und Wasser durch Einleiten von Chlorgas, legt sie auf 12 Stunden in eine 1 %ige Lösung von Kupfersulfat, wäscht sie 5—6 Stunden lang in destillirtem Wasser aus und bringt sie auf 12 Stunden in eine frische Lösung von 1 g Hämatoxylin in 100 ccm absolutem Alkohol und 300 ccm gutem destillirten

Wasser. Darauf kommen sie nochmals eben so lange in das Kupferbad, werden von Neuem gründlich gewaschen, entwässert und durch Chloroform in Paraffin gebracht. Die Schnitte schliesst man in Chloroformbalsam ein, worin sich die blaue Farbe der Axencylinder, des Plasmas und der Kerne der Nervenzellen einige Monate lang hält. — Nach Binet (Journ. Anat. Phys. Paris 30. Année 1894 p. 476) muss man die Ganglien in toto nach Viallanes behandeln, kann aber die Schnitte mit Safranin nachfärben, das dann zunächst vom Bindegewebe aufgenommen wird. — S. auch § 707 und 708.

---

29. Kapitel.

Methoden zur Untersuchung der Nerven. Färbung der Nervenfasern nach Weigert und Anderen.

a) Färbung des Myelins.

706. Allgemeines. Die wichtigsten Methoden zum Studium Verlaufes der markhaltigen Nervenfasern sind die von Weigert Hämatoxylin. Davon ist die eine 1884, die folgende 1885 und dritte 1891 publizirt worden. Während nun die gewöhnliche Färb durch Hämatoxylin auf einer Verbindung des Hämateïns mit Thoner beruht, liegt bei den Weigertschen eine solche mit Chrom oder Kupfer vor, die das Myelin in ganz spezifischer Weise färben sich noch dazu erst in den Geweben bilden. Im Einzelnen sind d Methoden theils durch Weigert selber, theils durch Andere modifizirt worden, und so ist die von 1884 (Fortschr. Med. 2. Bd. 18 p. 113, 190; Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 290, 564), wobei es um eine Verbindung mit Chrom handelt, gegenwärtig wohl überh Nicht so die beiden neueren, die auf der Bildung von Hämateïnkup beruhen. — M. Heidenhain (Arch. Mikr. Anat. 43. Bd. 1894 p. 4 konstatirt ausdrücklich, dass „die Weigertsche Nervenfärbung g vorzüglich unter Zugrundelegung des Hämateïns geräth“.

707. Weigerts Methode von 1885 (Fortschr. Med. 3. Bd. 1885 p. 2 Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 399, 484). Man härtet die Gewebe einer Lösung von Kaliumbichromat (so weit ich weiss, geht es m dem Gemisch von Müller oder von Erlicki eben so gut), aber nur lange, bis die Gewebe erst braun, nicht schon grün geworden s (die grünen sind indessen auch zu brauchen, wenn sie überhaupt einmal gut braun gewesen sind). Man kann dann, braucht es ab nicht, das Objekt in Celloidin einbetten, auf einen Kork aufkitten

wie gebräuchlich härten; jedenfalls bringt man es auf 1—2 Tage in eine halbgesättigte Lösung von neutralem Kupferacetat, und zwar in einem Brütofen. Hierdurch wird das Gewebe grün, das Celloidin bläulich grün. Die Schnitte legt man in ein Gemisch von Hämatoxylin $^3/_4$—1 g, Alkohol 10 g, Wasser 90 g und konzentrirter Lösung von Lithiumkarbonat 1 g; sind es solche vom Rückenmark oder der Markschicht des Hirns, so bleiben sie darin 2 Stunden, solche von der Hirnrinde hingegen 24 Stunden. Dann wäscht man sie mit Wasser und entfärbt sie in einem Gemisch von Borax 4 g, rothem Blutlaugensalz 5 g und Wasser 400 g, je nach dem Gewebe eine halbe bis mehrere Stunden lang, wäscht sie wieder und bringt sie durch Alkohol etc. in Balsam. Auch kann man sie der Kerne wegen vorher mit Alaunkarmin färben.

Die Gewebe dürfen in Alkohol oder sonstwie gehärtet sein, wenn sie nur in einem chromsauren Salz gebräunt worden sind, bevor sie in die Kupferlösung kommen. Flesch (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 50) bringt aber nicht das ganze Objekt, sondern erst die Schnitte in das Kupferbad, wäscht sie dann mit 70 %igem Alkohol aus und legt sie in das Hämatoxylingemisch. Paneth (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 213) verwendet statt des Hämatoxylins Extrakt von Blauholz; Breglia (Giorn. Ass. Med. Natural. Napoli Anno 1 1889 p. 169; Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 236) ebenfalls oder das von Fernambukholz. S. auch die Methode von Berlinerblau (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 50) zur Regeneration der Färblösung.

Gerota (Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 315) färbt Schnitte von Rückenmark nach Weigert in folgender Weise. Er löst 3 g Hämatoxylin in 30 g absol. Alkohol, fügt 100 g einer 1 %igen Alaunlösung hinzu, lässt 10 Tage stehen und färbt mit diesem Gemisch die Schnitte bei 37° C. wenigstens 4, besser 24 Stunden lang, bringt sie nach dem Abspülen mit Wasser auf 2 Stunden in das Kupferacetat (bei 37° C.) und differenzirt sie dann.

Die Resultate dieser Methode von Weigert sind äusserst schön: die blauschwarzen Nerven treten auf dem goldigen Grunde prachtvoll hervor. Auch eignet sie sich gleich gut für das periphere wie für das centrale Nervensystem und wird für die Embryologie der Wirbelthiere wohl sehr nützlich werden. Ferner ist sie mit Erfolg auf Lymphdrüsen und Haut anwendbar (Schiefferdecker in: Anat. Anzeiger 2. Jahrg. 1887 p. 680).

708. Weigerts Methode von 1891 (D. Med. Wochenschr. 42. Jahrg. 1891 p. 1184; Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 392). Das Material wird mit Kaliumbichromat gehärtet und in Celloidin eingebettet. Die gehärteten Blöcke kommen in ein Gemisch gleicher Theile einer kalt

gesättigten Lösung von neutralem Kupferacetat und einer 10 % ig-
Lösung von Seignettesalz (Kaliumnatriumtartrat), und zwar auf 24 Stund-
in einem Brütofen (grosse Stücke auf 48 Stunden, aber dann w-
die Flüssigkeit nach 24 Stunden gewechselt). Dann auf 24 Stunde-
ebenfalls im Brütofen, in eine gesättigte oder halbgesättigte Lösu-
von Kupferacetat, darauf zum Abspülen in Wasser, endlich in Alko-
von 70 % auf wenigstens $^1/_2$ Stunde. Nun werden Schnitte v-
höchstens 25 μ Dicke angefertigt und lose, nicht aufgeklebt, 24 Stun-
lang bei gewöhnlicher Temperatur in einem frischen Gemisch v-
9 Vol. einer schwachen Lösung von Lithiumkarbonat (7 Vol. gesätti-
Lösung mit 93 Vol. Wasser) mit 1 Vol. einer 10 %igen Lösung v-
Hämatoxylin in Alkohol belassen. (Beide Komponenten dieses Gemisch-
darf man vorräthig halten, jedoch die erstere nicht zu lange.) Dan-
wird die Färblösung abgegossen, die Schnitte werden mehrere Ma-
mit reinem Wasser abgespült und durch 90 %igen Alkohol, dara-
durch ein Gemisch von Karbolsäure und Xylol oder von Anilinöl (2 Thei-
und Xylol (1 Theil), endlich durch reines Xylol in Xylolbalsam ge-
bracht (Chloroformbalsam schadet der Färbung).

Die markhaltigen Fasern treten dunkelblau auf hellem, mitunt-
rosenfarbenem Grunde hervor. Soll der Grund besonders farblos sei-
so nimmt man statt des 2. Waschwassers eine ganz schwache Essi-
säure ($^1/_5$—$^1/_2$ %). Dickere Schnitte oder Schnittserien in Celloidi-
differenzirt man entweder mit dieser Essigsäure oder mit dem Gemis-
von Borax und rothem Blutlaugensalz (§ 707), das man aber n-
verdünnt; alsdann wird allerdings der Grund gelb.

Hat das Kupfersalz nur unvollständig gewirkt (z. B. wenn ma-
es bei gewöhnlicher Temperatur verwandt hat), so treten auch w-
lehrreiche Differenzirungen an Ganglienzellen auf; z. B. werden d-
Fortsätze der Purkinjeschen Zellen im Kleinhirn sehr deutlich. Indess-
neigen solche Präparate nachträglich zum Schwarzwerden, was bei de-
gut gerathenen nicht vorkommt.

Neuerdings hat Weigert (Anat. Hefte 2. Abth. 3. Bd. 1894 p. 21-
gefunden, dass die Präparate ohne Behandlung mit rothem Blutlaugen-
salz sich nicht gut halten. Er räth daher an, sie zwar mit Seignette-
salz zu behandeln (dies verhindert die Bildung von Niederschläge-
auf den Objekten), sie aber wie bei der Methode von 1885 mi-
rothem Blutlaugensalz zu differenziren.

Modifikationen der Methode von Weigert.

709. Methode von Pal (Wiener Med. Jahrb. 1886 und 1887 p. 589; Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 92 und 5. Bd. 1888 p. 88). Man verfährt zuerst wie nach Weigert (§ 707), lässt aber das Kupferbad fort, und färbt auch wie nach Weigert; dann wäscht man die Schnitte in Wasser (werden sie nicht tiefblau, so muss man zum Wasser eine Spur Lithiumkarbonat geben), bringt sie auf 20 bis 30 Sekunden in eine $^1/_4$ %ige wässerige Lösung von Kaliumhypermanganat, wäscht sie wieder und entfärbt sie in einer Lösung von je 1 g Oxalsäure und Kaliumsulfit ($K_2 SO_3$) in 200 g Wasser: in wenigen Sekunden wird die graue Substanz farblos, während die weisse blau bleibt. Nun wäscht man die Schnitte gut und kann sie auch noch mit Magdalaroth oder Eosin, oder besser mit Pikrokarmin oder Essigsäurekarmin färben (Genaueres s. im Original oder bei Behrens, Kossel & Schiefferdecker, Das Mikroskop, 1. Bd. p. 199).

Diese Methode giebt glänzendere Resultate als die von Weigert, da der Grund der Präparate ganz farblos ist. Indessen ist sie weniger sicher, mit anderen Worten weniger leicht zu kontroliren. Die Entfärbung ist energischer und rascher als gut ist: da sie nur wenige Sekunden dauert, so kann offenbar hierbei leichter ein Irrthum begangen werden und das Resultat ganz zu nichte machen.

Marcus (Neur. Centralbl. 14. Jahrg. 1895 p. 4; Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 241) härtet Rückenmark zuerst 2—4 Wochen lang in „$^1/_2$ %igem Formol“, schneidet Stücke von 5 mm Dicke heraus, legt sie auf eine Woche bei 37° C. in Müllers Gemisch, bettet sie in Celloidin ein, giebt die Schnitte auf einige Tage bis eine Woche in Müllers Gemisch zurück, wäscht sie in Spiritus und färbt sie dann nach Pal. — S. auch § 895.

Karusin und Tschernyscheff (Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 354) verwenden im Verfahren von Pal die Hämatoxylinlösung von Kultschitzky (§ 711) und färben die Schnitte 24 Stunden lang.

710. Methode von Kaiser (Neur. Centralbl. 12. Jahrg. 1893 p. 363; Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 249; die älteren Methoden sind ibid. 9. Bd. 1893 p. 468 referirt). Das Material legt man in Müllers Gemisch, schneidet es nach 2—3 Tagen in Scheiben von 2—4 mm Dicke, bringt diese auf weitere 5—6 Tage in das Fixirmittel zurück und dann auf eine Woche in das Gemisch von Marchi (unten § 715). Darauf wäscht man sie und bettet sie in Celloidin ein. Die Schnitte behandelt man 5 Minuten lang mit verdünntem Liq. Ferri sesquichlorati (1 Theil auf 1 Theil Wasser und 3 Theile Spiritus von 70 %),

wäscht sie in Weigerts Hämatoxylin (§ 707) ab und erwärmt sie in einer frischen Portion desselben einige Minuten lang, wäscht sie mit Wasser, differenzirt sie in Pals Gemisch (§ 709) und neutralisirt die Oxalsäure durch ganz schwaches Ammoniak.

711. Methoden von Kultschitzky (Anat. Anzeiger 4. Jahrg. 1889 p. 223, 5. Jahrg. 1890 p. 519). Von den beiden Methoden sei hier nur die zweite wiedergegeben. Das Material härtet man 1—2 Monate lang in Erlickis Gemisch, bettet es in Celloidin oder Photoxylin ein und färbt die Schnitte 1—3 (aber auch bis 24) Stunden lang in einem Gemisch von 1 g Hämatoxylin, etwas Alkohol und 100 ccm 2 % iger Essigsäure. Dann wäscht man sie in konzentrirter Lösung von Lithium- oder Natriumkarbonat; noch besser differenzirt werden sie aber, wenn man der Waschflüssigkeit 10 % einer 1 % igen Lösung von rothem Blutlaugensalz hinzufügt und sie darin einige Stunden lässt. Später werden sie gut mit Wasser gewaschen und in Balsam gebracht.

Wolters (Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1891 p. 466) verfährt ebenso, färbt aber die Schnitte 24 Stunden lang in dem auf 45° C. erwärmten Gemisch, taucht sie dann in Müllers Gemisch und differenzirt sie nach Pal. — Kaes (ibid. 8. Bd. 1891 p. 388; Neur. Centralbl. 1891 No. 15) färbt 2—3 Tage lang und differenzirt mehrere Male. Ob aber diese Modifikationen eine Verbesserung bedeuten, bleibt zweifelhaft.

712. Methoden von Mitrophanow (Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 361). Photoxylinschnitte werden auf wenigstens 24 Stunden bei 40° C. in ein Gemisch gleicher Theile einer gesättigten wässerigen Lösung von Kupferacetat und 90 %igem Alkohol gelegt, dann bei gewöhnlicher Temperatur wenigstens 10 Minuten lang im Hämatoxylingemisch von Kultschitzky (§ 711) gefärbt und mit Weigerts Ferricyankaliumgemisch differenzirt. Oder nach dem Kupferbade kommen sie auf wenigstens 10 Minuten in eine alkoholische Lösung von Hämatoxylin (1 g mit 4 ccm Essigsäure und 400 ccm absolutem Alkohol), dann in eine ¼ %ige Lösung von Cyankalium in 45 %igem Alkohol, bis das Photoxylin ganz entfärbt ist, dann in dieselbe unter Zusatz einer 1 %igen Lösung von rothem Blutlaugensalz bis zur Entfärbung der Muskeln. Später in beiden Fällen Wasser, Alkohol, Origanumöl und Balsam.

713. Rasche Methode von Berkley (Neur. Centralbl. 11. Jahrg. 1892 p. 270; Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 370). Scheiben von höchstens 2½ mm Dicke härtet man bei 25° C. 24—30 Stunden lang in Flemmings Gemisch, bringt sie, ohne sie zu waschen, direkt in absoluten Alkohol und wechselt diesen in den ersten 24 Stunden 2 Mal. Sind sie hart genug, so bettet man sie in Celloidin und schneidet sie. Die

Schnitte wäscht man mit Wasser, legt sie entweder über Nacht in eine konzentrirte Lösung von Kupferacetat oder hält sie darin bei 35—40° C. nur $^1/_2$ Stunde, wäscht sie dann wieder, färbt sie 15 bis 20 Minuten lang bei 40° C. im Hämatoxylin (s. unten), lässt sie abkühlen und differenzirt sie 1—3 Minuten lang im Weigertschen Gemisch von rothem Blutlaugensalz, das man noch mit $^1/_8$ Vol. Wasser verdünnen kann. Dann Wasser, Alkohol, Bergamottöl und Xylolbalsam.

Zur Bereitung des Hämatoxylingemisches setzt man 2 ccm gesättigte Lösung von Lithiumkarbonat zu 50 ccm kochendem Wasser, kocht noch einige Minuten und giebt $1^1/_2$—2 ccm einer 10% igen Lösung von Hämatoxylin in absolutem Alkohol dazu.

714. Noch andere Modifikationen oder ähnliche Methoden. Flechsig (Arch. Anat. Phys. Phys. Abth. f. 1889 p. 537; Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 71: mit Roth- oder Fernambukholz); Rossi (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 182); Mercier (ibid. 7. Bd. 1891 p. 480); Haug (ibid. 7. Bd. 1890 p. 153); van Walsem (ibid. 11. Bd. 1894 p. 236); Robertson (Brit. Med. Journ. 1897 p. 651; Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 80: Modifikation der Hellerschen Methode zur Färbung markhaltiger Nerven).

Hill (Brain Pt. 73 1896 p. 1, s. auch Phil. Trans. Vol. 184 B 1894 p. 399) färbt Stücke des Centralnervensystems 24 Stunden lang in Karmalaun, schneidet sie dann und färbt die Schnitte mit Hämatoxylin nach Weigert, wobei er aber das Entfärbgemisch (Kaliumhypermanganat oder rothes Blutlaugensalz) nur halb so stark nimmt: Nervenzellen, Fortsätze und marklose Fasern schwarz, markhaltige blau.

Andere Färbmittel für Myelin.

715. Methode von Marchi für degenerirte Nerven (Riv. Sper. Freniatr. Med. Leg. 1887 p. 208; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1893 p. 350). Man härtet die Nerven 1 Woche lang in Müllers Gemisch und legt sie dann auf einige Tage in ein Gemisch von 2 Theilen von diesem und 1 Theil 1%iger Lösung von Osmiumsäure. So färben sich nur die degenerirten Scheiden schwarz, während die normalen gelb werden. Diese Methode ist der von Weigert insofern überlegen, als sie von den degenerirten Nerven positive Bilder, die Weigertsche aber nur negative giebt.

Flatau (Anat. Anzeiger 13. Bd. 1897 p. 327) fertigt Längsschnitte durch das ganze Rückenmark von *Canis* in folgender Weise an. Das Rückenmark wird in einem Glascylinder voll Müllers Gemisch (oder zunächst auf 1 Tag lang voll 10%igem Formol) aufgehängt, wobei die Cauda equina mit einem Glasstabe beschwert wird, um Krümmungen zu vermeiden. Nach 1 Tag wird die Dura ventral und dorsal gespalten, nach 2—3 Wochen das Rückenmark selber in der Medianlinie, sodass beide Hälften nur noch am Conus medullaris zusammen-

hangen. Es kommt dann auf 3—5 Wochen in Marchis Gemisch, wird in Celloidin eingebettet, auf einem besonderen Stücke Holz von 35—40 cm Länge und 5 cm Breite, das bereits eine Celloidinplatte trägt, mit Celloidin befestigt und in Schnitte von 60—80 μ Dicke zerlegt.

716. Methode von Azoulay (Anat. Anzeiger 10. Jahrg. 1894 p. 25; C. R. Soc. Biol. Paris (10) Tome 1 1894 p. 629). Objekte, die mehrere Monate in Müllerschem Gemisch gewesen sind, wäscht man zwei Tage in Wasser, bettet sie in Celloidin ein und schneidet sie; die Schnitte wäscht man in Wasser, legt sie auf 5—15 Minuten in schwache Osmiumsäure (1:500 oder 1:1000), spült sie mit Wasser ab und bringt sie auf 2—5 Minuten in eine 5- oder 10%ige Lösung von Gerbsäure entweder im Ofen bei 50—55° C. oder über einer Flamme, bis Dämpfe aufsteigen. Dann wäscht man sie wieder 5 Minuten lang, färbt sie eventuell mit Karmin oder Eosin und bringt sie in Balsam. Sind die Schnitte zu dick, so muss man sie hinterher nach Pal oder mit verdünnter Eau de Javelle (1:50) behandeln. — Sind die Objekte bereits mit Osmium konservirt worden, also im Gemisch von Flemming etc., so kommen die Schnitte direkt auf 3—10 Minuten in das warme Tanninbad.

717. Methoden von Finotti (Arch. Path. Anat. 143. Bd. 1896 p. 167; Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 236). F. giebt drei Methoden zum Färben der Nervenfasern auf Schnitten an: 1) für die Axencylinder allein Hämateïnthonerde, dann ½—1%ige Lösung von Säurefuchsin (3 Minuten lang), Differenzirung in 75%igem Alkohol mit etwas Aetzkali; 2) für Axencylinder und Nervenmark starke Färbung in Hämatoxylin nach Delafield, dann einige Sekunden in konzentrirter Pikrinsäurelösung, darauf Säurefuchsin (½%), dann Alkohol mit Aetzkali; 3) die Schnitte von Objekten aus Müllers Gemisch kommen auf 4—10 Stunden in ein frisches Gemisch von konzentrirter Pikrinsäurelösung in Alkohol von 60% (3—2 Theile) und 1%iger Osmiumsäure (1 Theil), dann in Wasser, darauf in Alauncochenille.

718. Methode von Exner (Sitz. Ber. Akad. Wien 83. Bd. 3. Abth. 1881 p. 151). Man legt kleine Stücke vom Gehirn (höchstens 1 ccm gross) in 10 mal so viel 1%ige Osmiumsäure, erneuert diese nach 2 und auch nach 4 Tagen: nach 5—10 Tagen sind sie gewöhnlich durch und durch hart, werden dann ausgewaschen und eingebettet. Die Schnitte bringt man auf dem Objektträger in etwas Ammoniak zum Quellen, sodass nur die Fasern schwarz bleiben. Nach Lewis (Human Brain p. 105) zeigt diese Methode viel mehr Einzelheiten als irgend eine andere; hauptsächlich ist sie werthvoll für das Studium des Verlaufes

der markhaltigen Fasern. Zum Einschluss der Schnitte kann Glycerin mit Wasserglas dienen, aber nach einiger Zeit treten darin Kristalle auf. — Bellonci (Arch. Ital. Biol. Tome 6 1884 p. 405) härtet den Optikus der Säugethiere nur 14—20 Stunden lang in $^1/_2$—1 $^0/_0$iger Osmiumsäure und behandelt die Schnitte erst 3—4 Stunden lang mit 80 $^0/_0$igem Alkohol und dann mit Ammoniak.

719. Die Methoden von Paladino (§ 721) und von Ziehen (§ 764) färben auch das Myelin. — Vastarini-Cresi (Atti Accad. Med. Chir. Napoli Anno 50 1896) härtet Rückenmark in Formol, schneidet es später in dicke Scheiben, wäscht diese mit 40 $^0/_0$igem Alkohol aus, legt sie im Dunkeln in $^3/_4$- oder 1 $^0/_0$ige Lösung von Höllenstein (in Alkohol von 40 oder 70 $^0/_0$), wäscht sie sorgfältig aus und erhält so das Mark dunkel, fast schwarz gefärbt. — S. auch § 898.

720. Optische Methode von Ambronn & Held (Ber. Math. Physik. Cl. Ges. Wiss. Leipzig f. 1895 p. 37). Frische Nervenfasern werden in Normalsalzwasser mit dem Polarisationsapparat auf das Vorhandensein von Nervenmark geprüft; und zwar die peripheren Nerven einfach isolirt, von den Centralorganen hingegen Schnitte von 160 μ Dicke, die mit dem Gefriermikrotom hergestellt werden. Lichtquelle eine Auersche Gasflamme; Gipsplättchen Purpur I; als Linsen dienen C C und D D von Zeiss. An neugeborenen Kaninchen liess sich so das Auftreten des Nervenmarkes leicht erkennen. — Ueber das Myelin s. auch Gad & Heymans in: Arch. Anat. Phys. Phys. Abth. f. 1890 p. 531.

b) Färbung des Myelins und des Axencylinders.

721. Methode mit Jodpalladium nach Paladino (Rend. Accad. Napoli Anno 29 1890 p. 14, Anno 31 1892 p. 227; Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 237, 9. Bd. 1892 p. 238). Stücke von Material aus Kaliumbichromat, Chromsäure oder Sublimat, höchstens 5—8 mm dick, kommen auf 2 Tage in sehr viel $^1/_{10}$ $^0/_0$ige Lösung von Chlorpalladium (oben § 69: auf jedes Stück 150—200 ccm). Dann auf 24 Stunden in eine 1 $^0/_0$ige Lösung von Jodkalium, oder nach der zweiten Vorschrift in nur relativ wenig von einer 4 $^0/_0$igen Lösung und auch nur auf 1—2 Stunden, damit sich das rasch entstehende Jodpalladium nicht wieder auflöse. Schliesslich entwässert man sie, bettet sie eventuell durch Chloroform in Paraffin ein und legt die Schnitte in Balsam.

Neuerdings (Boll. Accad. Med. Roma Anno 19 1893 p. 256; Arch. Ital. Biol. Tome 22 1894 p. 40) bringt Paladino die Objekte aus Müllers Gemisch oder dem Kaliumbichromat (2—4 $^0/_0$) erst unter die Wasserleitung, dann allmählich in Alkohol von 96 $^0/_0$, und „entmarkt“ dann kleine Stücke davon, indem er sie im Brütofen auf je 1 Stunde

in absol. Alkohol und Benzol, in reines Benzol und wieder in absol. Alkohol legt. Dann bleiben sie 24 Stunden lang in kaltem absol. Alkohol und kommen nun in eine reichliche Menge des Chlorpalladiums (1—2 %) auf eine Woche oder länger, dann auf 1—2 Tage in das Jodkalium (4 %; nur wenig Lösung nehmen!), zum Schluss in Alkohol von 80 %, von 96 %, Aether, Celloidin (wird in Alhohol von 50 % gehärtet), nicht aber in Paraffin. Die Schnitte werden in Chloroformbalsam eingeschlossen.

722. Methoden von Sahli (Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 1). Schnitte von Material, das in Kaliumbichromat für die Weigertsche Methode gut gehärtet ist, wäscht man 5—10 Minuten lang mit Wasser, färbt sie mehrere Stunden in konzentr. wässeriger Lösung von Methylenblau, spült sie mit Wasser ab, färbt sie 5 Minuten lang in konzentr. wässeriger Lösung von Säurefuchsin, spült sie mit Alkohol ab und legt sie zur Differenzirung in viel Wasser: Axencylinder roth, Myelin blau. Spült man sie dagegen statt mit reinem Alkohol mit schwach alkalischem ($^1/_{10}$—1 % Aetzkali) ab, differenzirt sie wieder in Wasser und führt sie durch Cedernöl in Balsam, der in Cedernöl gelöst ist, über, so ist das Myelin theils roth, theils blau.

Sahli (l. c. p. 50) färbt auch mit Methylenblau allein, nämlich mit einem Gemisch von 24 Theilen gesättigter Lösung, 16 Theilen 5 %iger Lösung von Borax und 40 Theilen Wasser (es wird erst 24 Stunden nach der Bereitung filtrirt), wäscht die Schnitte so lange mit Wasser oder Alkohol, bis sich die graue Substanz deutlich von der weissen abhebt, und bringt sie dann (wie oben) in Balsam. Die Präparate halten sich aber nicht lange. — S. auch oben § 717 die Methoden von Finotti und unten § 897.

723. Methode von Adamkiewicz (Sitz. Ber. Akad. Wien 89. Bd. 3. Abth. 1884 p. 245; Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 587). Schnitte von Material, das 1—3 Monate lang in Müllers Gemisch gehärtet worden ist, wäscht man erst mit Wasser, dann mit Wasser und etwas Salpetersäure, färbt sie mit einer konzentr. Lösung von Safranin, behandelt sie mit Alkohol und Nelkenöl, bis sie keine Farbe mehr abgeben, bringt sie in Wasser mit etwas Essigsäure zurück, färbt sie mit Methylenblau und bringt sie wieder in Nelkenöl: Myelin roth, Kerne violett.

Nikiforow (Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 338) ändert diese Methode dahin ab, dass er nach dem Färben mit Safranin die Schnitte mit Goldchlorid oder einem anderen Metallsalze imprägnirt. — Ciaglinski (Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 19) und Ströbe (ibid. 10. Bd. 1893 p. 336) lassen Beide auf das Safranin Anilinblau folgen.

724. Methode von Nissl mit Congoroth (Münch. Med. Wochenschr. f. 1886 p. 528; Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 398). N. färbt die Schnitte 3 Tage lang mit einer Lösung von Congoroth (5 in 400 Wasser) und zieht sie dann mit saurem Alkohol (3 % Salpetersäure) aus.

725. Methode von Aronson (Centralbl. Med. Wiss. 28. Jahrg. 1890 p. 577). Schnitte von Material aus Erlitzkis Gemisch oder aus Müllers Gemisch (alsdann zunächst mit Kupferacetat zu behandeln) kommen auf 12—24 Stunden (bei 37° C. nur auf 1—3 Stunden) in folgendes Gemisch: Galleïn-Paste (bei Grübler zu haben) 3—4 ccm, Alkohol 20, destill. Wasser 100 ccm, konzentr. Lösung von Soda 3 Tropfen. Dann werden sie nach Weigert oder Pal oder mit Chlorkalk (einige Tropfen der konzentr. wässerigen Lösung auf ein Schälchen voll Wasser) differenzirt, darauf in eine konzentr. Lösung von Soda oder Lithiumkarbonat übertragen, bis sie roth werden, und durch Origanumöl in Balsam gebracht. Nervenfasern leuchtend roth. Da das Galleïn als Beize für basische Farbstoffe dient (p. 593), so kann man die Fasern blau färben, wenn man sie nach der Differenzirung mit Kaliumhypermanganat 12—24 Stunden lang mit Methylenblau (mehrere Tropfen einer konzentr. alkoh. Lösung auf ein Uhrglas voll Wasser) färbt und dann mit Wasser, Alkohol und Origanumöl gründlich auswäscht.

---

30. Kapitel.

Methoden zur Untersuchung der Nerven. Färbung der Nervenzellen nach Golgi und Anderen.

726. Allgemeines. Zum Studium der Axencylinder und Plasmafortsätze giebt es drei Hauptmethoden: man färbt entweder mit Methylenblau oder man imprägnirt nach Golgi mit Sublimat oder mit Silberbichromat. Ueber das Methylenblau s. oben im Kapitel 15; hier seien zunächst einige weniger wichtige Färbmethoden, dann die Golgischen und zum Schluss einige andere Imprägnationsmethoden erörtert.

a) Eigentliche Färbungen.

727. Karmin. Ammoniakkarmin ist zwar veraltet, aber für Uebersichtsbilder noch gut zu brauchen. Beales Karmin ist gut, besonders bei langem Färben. Die Hauptsache ist, dass man sehr langsam in äusserst schwachen Lösungen färbt. Das Material aus Kaliumbichromat darf vorher nicht in Alkohol gewesen sein (oben p. 57). Pikrokarmin wirkt ähnlich, hebt aber die nicht nervösen Elemente besser hervor. Material aus chromsauren Salzen färbt sich im Allgemeinen in beiden Karminen sehr langsam, wenn man jedoch (nach Obersteiner) die Schnitte in ein Uhrglas voll Farbe legt und dieses auf einem Drahtnetz über kochendes Wasser bringt, so genügen schon einige Minuten. Merkel (Handbuch d. Nervenlehre v. Henle, 1871) legt die Schnitte aus chromsauren Salzen auf 1—2 Minuten in eine Lösung von Chlorpalladium (1:300 bis 600), bis sie gelb werden, spült sie mit Wasser ab und färbt sie in starkem Ammoniakkarmin: Myelin gelb, Axencylinder, Nervenzellen und Neuroglia dunkelroth. Boraxkarmin ist besonders gut, wenn man hinterher noch Indigkarmin oder Anilinblau nimmt. So habe ich vorzügliche Präparate nach der Methode von Seiler (oben § 339) erhalten, und Flesch (Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 566, 2. Bd. 1885 p. 349) empfiehlt sehr das Merkelsche Gemisch (oben § 340). Alaunkarmin färbt nach Obersteiner die Kerne gut, besonders diejenigen der nicht nervösen Zellen. Im Uebrigen s. Schmaus (Münch. Med. Wochenschr. 38. Jahrg. 1891 p. 147; Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 230); Upson (Neur. Centralbl. 7. Jahrg. 1888 p. 319; Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 525); Freeborn (Amer. Month. Micr. Journ. Vol. 9 1888 p. 231; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1889 p. 305).

728. Anilin Blue-Black. Sanky (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 16 1876 p. 73), der es zuerst empfohlen hat, nimmt es in $^1/_2{}^0/_0$iger Lösung und wäscht die Schnitte dann 20—30 Minuten lang mit einer Lösung von Chloralhydrat aus. Lewis (ibid. p. 74; Human Brain p. 125) rühmt es sehr: er färbt die Schnitte 1 Stunde lang in einer $^1/_4{}^0/_0$igen Lösung und wäscht nur die von der Kleinhirnrinde 20 bis 30 Minuten lang mit Chloralhydrat (2 $^0/_0$), die von Hirn oder Rückenmark aber nicht. Vejas (Arch. Psychiatr. 16. Bd. 1886 p. 200) färbt mit sehr schwacher Lösung (1—3000), dafür aber 18—24 Stunden lang. Gierke (Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 379) hat in Deutschland keinen guten Farbstoff erhalten und findet auch das Auswaschen mit Chloralhydrat schädlich; ebenso Martinotti (ibid. p. 478).

Luys (Gaz. Méd. Paris 1876 p. 346) empfiehlt das Noir Colin sehr; er färbt damit in $^1/_{10}{}^0/_0$iger Lösung 3—4 Minuten lang.

Ielgersma (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 39) ist mit dem Anilin Blue-black äusserst zufrieden, aber nur mit dem englischen. Er färbt mit einer Lösung von 1:100 die Schnitte $^1/_4$ Stunde, mit einer von 1:800 5 Stunden und mit einer von 1:2000 12 Stunden lang. Neuroglia und Bindegewebe werden nicht gefärbt. Schmaus (Münch. Med. Wochenschr. 38. Jahrg. 1891 p. 147; Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 230) empfiehlt ebenfalls das englische Produkt (bei Grübler zu haben): in einer $^1/_4{}^0/_0$igen Lösung in 50 $^0/_0$igem Alkohol mit ein wenig Pikrinsäure färbt er die Schnitte 1 Stunde lang und erhält so das Celloidin fast farblos, während es sich in der einfachen wässerigen Lösung stark färbt.

729. Pikro-Nigrosin giebt nach Martinotti (Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 478) sehr gute Resultate, besonders für pathologische Objekte. Er färbt 2—3 Stunden oder Tage lang mit einer gesättigten Lösung von Nigrosin in gesättigter Lösung von Pikrinsäure und wäscht mit einem Gemisch von 1 Theil Ameisensäure und 2 Theilen Alkohol so lange aus, bis die graue und weisse Substanz sich schon dem blossen Auge deutlich von einander abheben.

730. Ehrlich-Biondisches Gemisch empfiehlt Rosin (Neur. Centralbl. 12. Jahrg. 1893 p. 1; Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1895 p. 77). Lindsay Johnson (in litt.) vermischt damit etwa $^1/_3$ Vol. einer 20$^0/_0$igen (gesättigten) Lösung von Nigrosin.

731. Naphthylaminbraun (von Grübler) wird von Kaiser (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 471) für Celloidinschnitte durch Rückenmark empfohlen:

die Schnitte färbt er einige Stunden lang in einer Lösung von 1 Theil auf 100 Theile Alkohol und 200 Theile Wasser, wäscht sie mit Alkohol und bringt sie durch Origanumöl in Balsam.

732. **Karmin und Methylenblau** nach Rehm (Münch. Med. Wochenschr. 39. Jahrg. 1892 p. 217; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1893 p. 389). Schnitte von Material aus Alkohol färbt man 5 Minuten lang in 1%igem Ammoniakkarmin, wäscht sie in Alkohol von 70% mit 1% Salpetersäure, dann in reinem, färbt sie ½ Minute lang in $^1/_{10}$%iger Lösung von Methylenblau und führt sie durch Origanumöl in Kolophonium über.

733. **Methylenblau** nach Rehm (l. c.) zum Färben des Plasmas. Rehm modifizirt die Methode von Nissl (oben § 691) dahin, dass er die Schnitte von Material aus Alkohol ½—1 Minute lang mit heisser $^1/_{10}$%iger Lösung von Methylenblau färbt, sie in Alkohol von 96% sorgfältig auswäscht und durch Origanumöl in Balsam oder Benzinkolophonium bringt. Nervenzellen dunkelblau, Bindegewebe heller, grünlich. Noch schärfer wird der Unterschied, wenn man nur ½ Minute lang färbt, mit Alkohol von 90° wäscht und 15—30 Minuten lang mit einer $^1/_{10}$%igen Lösung von Fuchsin in 96%igem Alkohol nachfärbt, 1 Minute lang in Alkohol auswäscht, bis keine rothe Farbe mehr ausgezogen wird, und durch Nelkenöl in Balsam etc. bringt. Nervenzellen blauroth mit ungefärbten Kernen, die übrigen Kerne lebhaft roth. Dieser Unterschied zeigt sich aber an embryonalem Gewebe nicht. Die Kerne des Bindegewebes und der Gefässe treten auch hervor, wenn man einige Minuten lang in 1%iger Lösung von Eosin, eben so lange in warmer $^1/_{10}$%iger Lösung von Dahlia färbt; oder zuerst in Nigrosin (1%) und dann ½ Stunde lang in Fuchsin ($^1/_{10}$%).

Ramón y Cajal (Rev. Trimestr. Micr. Madrid Vol. 1 1896 p. 1) färbt die mit Alkohol von 96% oder besser mit Sublimat fixirten Objekte in einem Gemisch gleicher Theile 1%iger Lösungen von Methylenblau und von Fuchsin; er will damit bessere Resultate erzielen als nach der komplizirten Methode von Rehm.

734. **Methode von Mallory** mit Hämatoxylin und Phosphormolybdänsäure (Anat. Anzeiger 6. Jahrg. 1891 p. 375). Nach Schiefferdecker & Vobis (Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 341) färben sich Celloidinschnitte von Material aus Müllers Gemisch gut damit.

735. **Vanadiumchlorid** nach Wolters (Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1891 p. 471). Das nach Kultschitzky gehärtete und mit Alkohol behandelte Material (oben § 53) wird in Celloidin oder Paraffin eingebettet und geschnitten. Die Schnitte behandelt man 24 Stunden lang mit einem Gemisch von 1 Theil 10%iger Lösung von Chlorvanadium und 4 Theilen 8%iger Lösung von Aluminiumacetat, wäscht sie 10 Minuten lang mit Wasser und färbt sie 24 Stunden in Kultschitzkys Lösung von Hämatoxylin (1 g auf 50 ccm einer 2%igen Essigsäure). Dann wäscht man sie in 80%igem Alkohol und ½% Salzsäure so lange, bis sie hell blauroth werden, schafft die Säure durch Alkohol sorgfältig

fort und führt die Schnitte durch Origanumöl in Balsam über. Bloss der Axencylinder ist gefärbt, das Myelin nur, wenn die Säure nicht ordentlich gewirkt hat.

736. Congoroth. Alt (Münch. Med. Wochenschr. 39. Jahrg. 1892 No. 4; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 81) färbt einige Stunden lang mit Congoroth in absolutem Alkohol und wäscht mit reinem Alkohol aus. Schiefferdecker empfiehlt in seinem Referate die Methode nicht. Squire hingegen (Methods p. 48), der eine 2 %ige Lösung in Wasser benutzt, rühmt sie sehr.

737. Die Methoden von Apáthy s. oben § 703 u. 704 die von Viallanes § 705.

b) Imprägnationen.

738. Der Methoden von Golgi giebt es zwei: die mit Sublimat (s. unten § 758) und die mit **Höllenstein.** Die letztere hat Golgi in drei Weisen ausprobirt, die als die langsame, die rasche und die gemischte Methode bekannt sind. Die rasche wird gegenwärtig am meisten zur Untersuchung des Verlaufes und Verhaltens der Axencylinder und der Plasmafortsätze benutzt und darf als die klassische Methode für die Feststellung der feineren Beziehungen der Neuronen in gehärteten Geweben bezeichnet werden: sie leistet hierin so viel wie für frisches Gewebe das Methylenblau.

Allgemeiner Charakter der Imprägnation. Die Präparate sehen durchaus nicht wie gefärbt aus und gewähren sogar einen ganz anderen Anblick als die Imprägnationen frischer Gewebe mit Höllenstein oder Goldchlorid. Auch sind sie nur partiell imprägnirt, d. h. von den Elementen des Gewebes, seien sie nun nervös oder nicht, ist immer nur eine gewisse Anzahl versilbert. Das ist aber durchaus kein Nachtheil, eher ein Vorzug der Methode, denn nähmen alle Elemente im Präparate das Silber so intensiv auf, wie es die wenigen thun, so würde man den Wald vor Bäumen nicht sehen. Aber gerade die wenigen treten so lebhaft und auf so lange Strecken hervor, dass man sie zwischen den ungefärbt bleibenden Elementen (den Stützzellen etc.) auf weite Entfernung verfolgen kann. Dies leistet bisher keine andere Methode in solcher Vollkommenheit, dafür aber zeigt die Golgische keine histologischen Einzelheiten in den anderen Geweben des Präparates, und absolut keine cytologischen. Sie ist daher eine ganz spezielle Methode.

Uebrigens imprägnirt sich nicht nur das Nervengewebe, vielmehr hat man die Methode erfolgreich auch zum Studium der

Gallencapillaren, Drüsengänge, elastischen Fasern etc. benutzt. Deswegen aber, und da sie auch ganz launenhaft immer nur wenige Elemente im Präparate imprägnirt, muss man bei der Deutung der Bilder vorsichtig sein. Oben § 366 ist vom Gold gesagt worden, dass „auch die allerbesten Vergoldungen nur so weit Glauben verdienen, wie sie etwas zeigen, dagegen gar keinen Beweis dafür liefern, dass Dinge, die sie nicht zeigen, auch nicht existiren". Diese Warnung gilt wenigstens ebenso sehr hier. Dazu kommt noch als weitere Quelle der Irrthümer der Umstand, dass die Methode häufig Niederschläge von Silberbichromat liefert, die den Dendriten und anderen Feinheiten an den Nerven ganz ähnlich sehen. Mir schreibt ein Freund, er habe eine Kartoffel „golgificirt" und sehr schöne Nervenfasern dargestellt, und Friedländer (Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1895 p. 168) beschreibt ähnliche Kunstprodukte in Eiweiss etc. Sicherlich ist daher Vorsicht bei der Deutung der Bilder nöthig. (S. auch § 742.)

Dass die Methode sich auch für die Wirbellosen eignet, zeigen die Arbeiten von Ramón y Cajal über die Muskeln der Insekten, von Lenhossék über die Nerven von *Lumbricus*, von Retzius über die Retina der Cephalopoden etc.

In ihren Einzelheiten ist die Methode durch andere Forscher stark modifizirt worden; die bedeutendste Aenderung ist die doppelte Imprägnation nach Ramón y Cajal (§ 744). Golgi selbst hat sich ausführlich über seine Methode in den Arch. Ital. Biol. Tome 4 1883 p. 92 ff. ausgesprochen, später ibid. Tome 7 1886 p. 15 ff. Der letzteren Publikation entnehme ich die folgende Darstellung.

739. Golgis **langsame** Methode mit Höllenstein (l. c. p. 17). Man härtet entweder in Kaliumbichromat oder in Müllers, weniger gut aber in Erlickis Gemisch, und zwar gewöhnlich in Kaliumbichromat von 2 %, das man allmählich unter häufigem Wechsel der Lösung bis auf 5 % verstärkt. Am besten nimmt man ganz frisches Gewebe (24—48 Stunden nach dem Tode ist es auch noch brauchbar), und die Stücke dürfen höchstens 1 ½ cm gross sein. Grosse Schwierigkeiten bereitet es, genau die richtige Härte zu treffen; präzise Vorschriften lassen sich hierüber nicht geben. Im Sommer kann man schon mit 15—20 Tagen auskommen, und das Material bleibt auch bis zu 50 Tagen verwendbar; bei kaltem Wetter dauert es meist 1 Monat, und es bleibt gut bis zu 4 Monaten. Man muss es eben ausprobiren, indem man im Winter alle 8—10 Tage, im Sommer

häufiger, ein Stück in das Silberbad bringt und zusieht, ob die Reaktion eintritt. Gut ist auch die Injektion des Härtmittels (2 $^1/_2$ $^0/_0$ iger Lösung von Kaliumbichromat) in die Organe. Die Härtung wird durch konstantes Erwärmen auf 20—25° C. beschleunigt, aber man riskirt leicht ein Uebermaass von Härte, auch sind die weiteren Resultate nicht so günstig.

Zur Imprägnation bringt man die Stücke aus dem Härtgemisch in ein Bad von Höllenstein; gewöhnlich nimmt man hierzu eine $^3/_4$ $^0/_0$ ige Lösung, jedoch scheint eine $^1/_2$ $^0/_0$ ige besser für nicht ganz harte, und eine 1 $^0/_0$ ige besser für etwas überhärtete Objekte zu sein. Jedenfalls muss man relativ viel Lösung nehmen. Da nun beim Einlegen in das Bad sich sofort viel Silberbichromat ausscheidet, sodass es schwächer wird, so wäscht man die Objekte am besten vorher in einer schwächeren Lösung ab, bis auch beim Einlegen in ein neues Quantum kein Niederschlag mehr entsteht; hierzu können die gebrauchten Bäder dienen. Um das definitive Bad braucht man sich dann weiter nicht zu kümmern, es sei denn, dass es nach 6—10 Stunden doch etwas gelb würde, und dann muss es ersetzt werden. Im Dunkeln braucht man es nicht zu halten, wohl aber stellt es man im Winter vortheilhaft an einen warmen Platz. Die Reaktion tritt nach 24—30, nur ausnahmsweise nach 48 Stunden ein, jedoch kann man die Objekte ohne Schaden Monate lang darin lassen.

Sobald ein Versuch ergiebt, dass die Imprägnation gut gelungen ist, bringt man die Objekte in Alkohol und wechselt diesen so oft, bis er ganz klar bleibt, auch wenn sie schon 2—3 Tage in ihm sind. Denn für die gute Erhaltung muss der Ueberschuss an Silber sorgfältig entfernt werden. Nun macht man die Schnitte (§ 756), wäscht sie 3 oder 4 mal mit Alkohol, bringt sie auf einige Minuten in Kreosot, dann auf 10—15 Minuten in Terpentinöl, endlich in Balsam, besser aber in Dammar, und jedenfalls ohne Deckglas. So halten sie sich, namentlich im Dunkeln, sehr gut, während sie unter dem Deckglas verderben (unten § 753). Golgi hat viele Präparate 9 Jahre lang unverändert gehabt.

Die Reihenfolge, in der sich die Elemente imprägniren, ist: erst die Axencylinder, dann die Ganglienzellen, zuletzt die Neurogliazellen.

Hunter (Journ. Anat. Phys. London Vol. 32 1897 p. 109) härtet ein ganzes Hirn oder Rückenmark 1$^1/_2$—6 Monate lang in Müllers Gemisch, schneidet dann kleine Stücke davon ab, wäscht diese mit Wasser, bringt sie (bei Blut-

wärme) auf 24 Stunden in eine 1 oder 2 mal zu wechselnde $^3/_4$ %ige Lösung von Höllenstein, bettet sie in Celloidin und schneidet sie wie gewöhnlich.

740. Golgis **rasche** Methode mit Höllenstein (l. c. p. 33). Man legt kleine Stücke von ganz frischem Gewebe in ein Gemisch aus 4 Theilen 2—2 $^1/_2$ %iger Lösung von Kaliumbichromat und 1 Theil 1 %iger Osmiumsäure. Hierin werden sie schon am 2. oder 3. Tage zur Imprägnation reif, noch besser in den nächsten Tagen, aber diese günstige Eigenschaft ist am 10.—12. Tage meist wieder ganz verloren. Man imprägnirt die Stücke, schneidet sie und legt die Schnitte ein wie bei der vorigen Methode. Jedoch darf das imprägnirte Material zwar im Höllenstein beliebig lange, im Alkohol aber höchstens 2 Tage bleiben. Im Ganzen ist diese Methode nicht nur wegen ihrer Schnelligkeit, sondern auch wegen der Sicherheit und Zartheit der Resultate allgemein sehr beliebt, während Golgi selbst die folgende vorzieht.

741. Golgis **gemischte** Methode mit Höllenstein (l. c. p. 34). Die Stücke frischen Gewebes legt man 2—25 oder 30 Tage in die gebräuchliche Lösung von Kaliumbichromat, bringt aber alle 2—4 Tage einige in das Gemisch mit der Osmiumsäure nach der raschen Methode, härtet sie darin 3 oder 4 bis 8 oder 10 Tage lang und behandelt sie im Uebrigen wie nach der raschen Methode. Golgi zieht diese Methode vor: 1. weil man die Reaktion in ganz verschiedener Stärke verfolgen kann, falls man nur genug Stücke eingelegt hatte; 2. weil man etwa 25 Tage lang immer Stücke vorräthig hat, die sich versilbern lassen und doch auch den Prozess jederzeit dadurch beschleunigen kann, dass man sie in die Osmiumsäure bringt; 3. weil die Resultate noch zarter ausfallen, wie sich besonders an dem „funktionellen" oder nervösen Fortsatze der Nervenzellen zeigt.

742. Theoretisches über die Methode von Golgi. Die obigen Methoden haben sich als äusserst werthvoll auf den meisten Gebieten der Nervenkunde erwiesen. Glänzende Resultate haben sie beim Studium der peripheren Nerven und ihrer Ursprünge oder Enden, ferner bei dem der Beziehungen zwischen den Fasern und Zellen in den Centralorganen ergeben. Jedoch hat sich gleichzeitig als Mangel herausgestellt, dass der Eintritt der richtigen Reaktion und die Haltbarkeit der Präparate sehr unsicher sind. Hierüber ist denn auch eine ausgedehnte Diskussion entstanden, die aber leider noch nicht sehr weit geführt hat.

Wahrscheinlich beruht die Methode darauf, dass sich in den Geweben ein Niederschlag von Silberbichromat bildet, der im auffallenden Lichte braun, im durchfallenden schwarz ist. Das Problem besteht nun darin, ihn unverändert zu konserviren, indessen ist das nicht leicht zu lösen, denn ohne besondere Maassregeln hält er sich nicht beim Einbetten der Stücke in Paraffin, auch meist nicht beim Einschliessen der Präparate in Balsam und verdirbt sogar später oft genug.

Weigert (Anat. Hefte 2. Abth. 5. Bd. 1896 p. 7) bespricht die Methoden von Golgi ausführlich, drückt sich aber unter Anderem sehr reservirt dahin aus, dass der Niederschlag jedenfalls irgend ein Silberchromat sei. Die Osmiumsäure sei für die Reaktion nicht prinzipiell nöthig (s. unten § 747).

Eine ausgedehnte Reihe von Untersuchungen über die Methode von Golgi hat A. Hill angestellt (The Chrome-Silver Method [etc.] in: Brain Pt. 73 1896 p. 1). Er injicirt die Lösung von Kaliumbichromat (ohne Osmiumsäure) dem Thiere sofort nach dem Tode, bevor noch das Herz stillsteht, durch die Aorta, setzt ihr aber, um die Kontraktion der Gefässe zu verhindern, 1 % Milchsäure zu. Dass das Härtgemisch (und später die Silberlösung) rasch eindringe, scheint ihm für das Gelingen der Reaktion von grosser Wichtigkeit zu sein. Am leichtesten permeabel ist das Centralnervensystem von *Erinaceus,* kann daher in toto behandelt werden. Auf die Länge der Härtung kommt nicht viel an; Wärme beschleunigt die Reaktion, ändert sie aber qualitativ nicht; ob man im Licht oder im Dunkeln operirt, ist gleichgültig; das Einbetten in Celloidin mag ruhig mehrere Tage dauern, und man erhält dann sogar bessere Schnitte, als wenn man rasch verfährt. (Man gebe zum Aether-Alkohol, in dem das Objekt liegt, von Zeit zu Zeit trocknes Celloidin, sodass erst nach 4 Tagen die Lösung dick genug ist.) Die Osmiumsäure ist unnöthig. Statt des Höllensteins empfiehlt sich eine etwa $^3/_4$ %ige Lösung von Silbernitrit, der man $^1/_{1000}$ Ameisensäure zusetzt. Die Färbung nach Golgi beruht nicht auf Bildung von Silberchromat, sondern eines „reduced salt (sub-salt) of silver". Auch Gehirne, deren Gefässe lange mit Salzwasser oder Milchsäure ausgewaschen sind, färben sich noch gut. Wahrscheinlich reagiren nicht die leitenden Fibrillen, sondern das flüssige oder halbflüssige „Neuroplasma", worin sie liegen, auf die Silberlösung.

Nach Azoulay (C. R. Soc. Biol. Paris (10) Tome 1 1894 p. 839), der die Vorgänge bei der Golgischen Methode an Schnitten unter dem Mikroskop verfolgt hat, handelt es sich dabei nur um eine „cristallisation ténue de chromate d'argent dans les éléments".

Dogiel (Anat. Anzeiger 10. Bd. 1895 p. 555) injicirt die Gefässe oder Drüsengänge vor der Behandlung nach Golgi mit irgend einer Farbmasse, um sie von den Nerven sicher unterscheiden zu können.

743. Ramón y Cajal, der viele wichtige Arbeiten nach der Golgischen Methode publizirt hat, bedient sich stets der raschen Methode. Näheres hierüber, soweit die Hirnrinde von Säugethieren in Betracht kommt.

s. in: La Cellule Tome 7 1891 p. 125 (Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 239). Um die Bildung von Niederschlägen auf den Objekten zu verhüten, wendet er nach Sehrwald (unten § 751) Gelatine an. Ist hingegen weder mit der Bromwasserstoffsäure von Greppin (unten § 754) noch mit dem Goldchlorid von Obregia (unten § 755) zufrieden, da sie zwar die Präparate stabiler, aber das feinere Verhalten der Fasern undeutlicher machen. Aehnlich verfährt er mit Embryonen von *Gallus* (Anat. Anzeiger 5. Jahrg. 1890 p. 85).

744. Doppelte Imprägnation nach Ramón y Cajal. In einer spanischen Arbeit über die sympathischen Ganglien (s. Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 239) beschreibt Ramón seine „doppelte oder intensive“ Methode. Er härtet Stücke von der embryonalen Wirbelsäure von *Gallus* 3 Tage lang im Gemisch von Osmiumsäure und Kaliumbichromat (§ 740), legt sie dann auf 36 Stunden in die $^1/_2$—$^3/_4$ %ige Lösung von Höllenstein, bringt sie wieder auf 36—48 Stunden in jenes Gemisch zurück (oder in eins, das nur 1 Theil Osmiumsäure auf 10 Theile Bichromat enthält), wäscht sie rasch mit Wasser ab und bringt sie nochmals auf 36—48 Stunden in den Höllenstein. Hat man sie zuerst im Osmium-Bichromat zu lange (4 Tage) oder zu kurz (1 Tag) gelassen, so gelingt die zweite Behandlung damit nicht, und dann muss man den Prozess zum dritten Male vornehmen.

Diese Modifikation der Golgischen Methode ist vielleicht die wichtigste von allen.

745. Kallius (Anat. Hefte 1. Abth. 3. Bd. 1894 p. 527; Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 154) hat oft mit Vortheil statt des Kaliumbichromats das Ammoniumsalz oder Natriumsalz verwandt und alle Operationen im Dunkeln vorgenommen, dabei auch nur selten zur doppelten Imprägnation greifen müssen.

746. Smirnow (Internation. Monatschr. Anat. Phys. 10. Bd. 1893 p. 241; Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 254) härtet zum Studium der Nervenenden in der Menschenhand die Stücke in Altmanns Gemisch (gleichen Theilen von 5 %igem Kaliumbichromat und 2 %iger Osmiumsäure) 5—10 Tage lang und imprägnirt sie mit 1 %igem Höllenstein. Für die Nervenenden in der Haut von *Lumbricus* (Anat. Anzeiger 9. Jahrg. 1894 p. 571) härtet er 5—28 Tage lang in einem Gemisch gleicher Theile von 5 %igem Bichromat und 1 %iger Osmiumsäure.

747. Kolossow (Arch. Mikr. Anat. 49. Bd. 1897 p. 592) härtet die Objekte 1—7 Tage in einer 3—5 %igen Lösung von Kaliumbichromat in $^1/_4$ %iger Osmiumsäure, wäscht sie dann mit destill. Wasser, trocknet sie mit Löschpapier ab und legt sie auf 2—3 Tage in eine 2—3 %ige Lösung von Höllenstein in $^1/_4$—$^1/_2$ %iger Osmiumsäure. Die Imprägnation soll viel vollständiger und

reiner sein als sonst, und dies soll auf der Gegenwart der Osmiumsäure beruhen. — S. auch Juschtschenko in: Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 82.

Ueber das Verfahren von Nabias s. unten § 825.

748. Ueberhärtete Gewebe, die 3—4 Wochen lang im Gemisch von Osmiumsäure und Kaliumbichromat gewesen sind, imprägniren sich nicht mehr mit Silber (oben p. 350). Man kann sie jedoch nach Golgi (Internation. Monatschr. Anat. Phys. 11. Bd. 1894 p. 326; Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 389) wieder gut machen, indem man sie mit einer halb gesättigten Lösung von Kupferacetat so lange wäscht, bis sie keinen Niederschlag mehr geben, und dann auf 5—6 Tage in das obige Gemisch zurück bringt. Solches Material giebt nach der Imprägnation äusserst lehrreiche Schnitte, die sich auch in eingedicktem Cedernöl unter dem Deckglase halten.

749. Böhm und später Oppel (Anat. Anzeiger 5. Jahrg. 1890 p. 143; 6. Jahrg. 1891 p. 165) nehmen für die Nerven in der Leber im langsamen Verfahren statt des Kaliumbichromats der Eine eine $^1/_2$ %ige Lösung von Chromsäure (48 Stunden lang), der Andere eine $^1/_2$ %ige Lösung von Kaliummonochromat (24 Stunden lang, aber die Stücke sind vorher in Alkohol gehärtet).

Berkley (Anat. Anzeiger 8. Jahrg. 1893 p. 772) bringt von der Leber Stücke von höchstens 1 $^1/_2$ mm Dicke noch warm in eine warme halb gesättigte wässerige Lösung von Pikrinsäure und von da nach 15—30 Minuten auf wenigstens 48 Stunden bei Abschluss von Licht und einer Temperatur von wenigstens 25° C. in ein Gemisch von 16 Theilen 2 %iger Osmiumsäure und 100 Th. gesättigter Lösung von Kaliumbichromat, das vorher mehrere Tage der Sonne ausgesetzt gewesen ist. Zuletzt behandelt er sie in der gebräuchlichen Weise mit Höllenstein (Lösung von $^1/_4$ und $^3/_4$ %) wenigstens 5 Tage lang, bettet sie in Celloidin ein etc.

750. Gemische mit Formaldehyd. Strong (Anat. Anzeiger 10. Jahrg. 1895 p. 494) verwendet es statt der Osmiumsäure: er setzt zur 3 $^1/_2$- bis 5 %igen Lösung von Kaliumbichromat 2 $^1/_2$—5 % „Formalin“ und vermeidet so die Ueberhärtung. Aehnlich Durig (ibid. p. 659): er härtet 3 Tage lang in einer 3 %igen Lösung von Kaliumbichromat, die 4—6 % Formaldehyd enthält, und imprägnirt dann doppelt nach Ramón y Cajal. — Fish (Trans. Amer. Micr. Soc. Vol. 17 1896 p. 319) härtet 3 Tage lang in 2 Theilen Formalin und 100 Theilen einer 3 %igen Lösung von Kaliumbichromat (nachher 3 Tage in $^3/_4$ %igem Höllenstein) oder noch besser in 100 Theilen von Müllers Gemisch, 2 Theilen 10 %igem Formalin und 1 Theil 1 %iger Osmiumsäure. Diese Gemische macht man am besten direkt vor dem Gebrauche und

stellt sie ins Dunkle. — Kopsch (Anat. Anzeiger 11. Bd. 1896 p. 72..) mischt kurz vor dem Gebrauche 40 ccm einer 3 $^1/_2$ $^0/_0$ igen Lösun. von Kaliumbichromat mit 10 ccm Formol, legt kleine Stücke Gewe.. aber im Ganzen nur bis zu 2 ccm Substanz, hinein, schüttelt häuf. um und bringt die Objekte nach 24 Stunden in die reine Lösung v.. Kaliumbichromat, wo sie nur 1 Tag (Gallen- und Sekretcapillaren Netzhaut) oder 3—6 Tage (Netzhaut, Hirn etc.) bleiben und dann i. die Silberlösung ($^3/_4$ $^0/_0$) kommen. Die Blutgefässe imprägniren si. oft so stark, dass sie im mikroskopischen Bilde stören. Auch 24 b.. 48 Stunden altes Material lässt sich noch gut verwenden.

van Gehuchten (in litt.) ist hingegen mit dem Formaldehyd al. Substitute für die Osmiumsäure nicht zufrieden.

751. Gelatine nach Sehrwald (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1890 p. 45..). Da sich beim Golgischen Verfahren auf den Objekten häufig star.. Niederschläge bilden und die Klarheit der Bilder beeinträchtigen, s.. umkleidet Sehrwald sie vorher mit Gelatine. Er giesst nämlich ein. schwach erwärmte 10 $^0/_0$ ige Lösung von Gelatine in ein Papierkästche.. bettet die Objekte hinein und versenkt sie damit in das Silberbad. Nach der Versilberung wäscht er die Gelatine mit warmer gesättigte. Lösung von Silberchromat ab. Mit der Methode von Martin.. (Internation. Monatschr. Anat. Phys. 7. Bd. 1890 p. 69), die Objek.. einfach in Filtrirpapier einzuwickeln, ist Sehrwald nicht einverstande..

752. Aldehyd. Vassale & Donaggio (Monitore Z. Ital. Anno . 1895 p. 82) bringen Stücke von höchstens 1 cm Durchmesser a.. 15—20 Tage in ein Gemisch von 5 Theilen Aldehyd und 100 Theile. 3—4 $^0/_0$ iger Lösung von Kaliumbichromat. (Nach einigen Tage.. wenn die Flüssigkeit dunkler wird, muss man sie wechseln.) Die weitere Behandlung nach Golgi.

753. Konservirung der Präparate. Aus den Mittheilungen v.. Sehrwald (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1890 p. 443), Samassa (ibid. 7. Bd. 1890 p. 26) und Fick (ibid. 8. Bd. 1891 p. 168) über die Konservirun.. der Präparate geht für die Praxis nur so viel hervor, dass man ent.. weder nach der ursprünglichen Vorschrift von Golgi kein Deckgl.. auflegen darf, oder dass man erst den Balsam (mit den Schnitten darin) durch sorgfältiges Erwärmen ganz wasserfrei machen muss, ehe man es auflegt. Die letztere Methode (Fick) empfiehlt auch Hub.. (Anat. Anzeiger 7. Jahrg. 1892 p. 587).

754. Bromirung der Schnitte. Greppin (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. f. 1889 Suppl. p. 55; Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 66) findet, dass Bromwasserstoffsäure, wie Neumann vorschlägt, die Präparate nach der langsamen Methode von Golgi gegen das Deckglas unempfindlich macht. Nach dem Versilbern schneidet er mit dem Gefriermikrotom, behandelt die Schnitte 30—40 Sekunden lang mit 10%iger Bromwasserstoffsäure, wäscht sie tüchtig mit Wasser und bringt sie in Balsam. Wenn man sie noch im Nelkenöl 10—15 Minuten lang in die Sonne legt, so werden sie violett und zeigen die Einzelheiten schärfer. Mitunter behandelt man sie auch zweckmässig nach der 10%igen Säure 20—30 Sekunden lang mit einer 40%igen. Auch vertragen sie die Färbung mit Hämatoxylin nach Pal.

755. Vergoldung der Schnitte nach Obregia (Arch. Path. Anat. 122. Bd. 1890 p. 387; Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 97). Man schneidet das Material entweder uneingebettet oder in Celloidin oder Paraffin, wobei man aber Alkohol unter 94—95 % nicht anwenden darf. Dann bringt man die Schnitte aus absol. Alkohol in ein Gemisch von 10 ccm absolutem Alkohol mit 8—10 Tropfen einer 1 % igen Lösung von Goldchlorid, die man ½ Stunde vorher anfertigt und bis dahin im diffusen Licht lässt, aber mit den Schnitten ins Dunkle stellt. Die Schnitte bleiben je nach der Dicke 15—30 Minuten darin, werden dann rasch in 50 % igem Alkohol und in Wasser gewaschen, 5—10 Minuten lang in eine 10 % ige Lösung von Natriumhyposulfit gelegt, gut ausgewaschen und entweder sofort in Balsam gebracht (mit Deckglas!) oder vorher mit Karmin etc. gefärbt. Diese Methode eignet sich auch für Material, das mit Sublimat nach Golgi (unten § 758) behandelt worden ist.

756. Schneiden. Nach Sala (Zeit. Wiss. Z. 52. Bd. 1891 p. 18) ist die Methode von Greppin (§ 754) geradezu schädlich. Auch Sehrwalds Methode zum Einbetten in Paraffin, um dünne Schnitte zu bekommen, taugt nicht. Denn das Hauptverdienst der Methode von Golgi besteht ja darin, dass sie die Fortsätze weithin zu verfolgen erlaubt, was doch bei sehr dünnen Schnitten nicht angeht. Man wäscht daher die Objekte, wenn sie aus dem Höllenstein kommen, am besten mit Wasser aus, klebt sie mit Gummi arabicum auf einen Kork, härtet das Gummi in Alkohol einige Stunden lang und schneidet ohne besondere Einbettung mit dem Mikrotom.

757. Reduktion des Silbers nach Kallius (Anat. Hefte 1. Abth. 2. Bd. 1892 p. 269; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1893 p. 477). 1 g Hydrochinon, 8 g Natriumsulfit und 15 g Kaliumkarbonat werden in 50 g destillirtem Wasser gelöst; von dieser Lösung verdünnt man 10 ccm mit 115 ccm Wasser, setzt ferner 40—60 ccm

absoluten Alkohol hinzu und legt die Schnitte einige Minuten lang hinein, ... sie dunkelgrau bis schwarz werden. Dann bringt man sie auf 10—15 Min... in 70%igen Alkohol, auf 5 Minuten in eine etwa 20%ige Lösung von Natri... hyposulfit, endlich auf wenigstens einen Tag in sehr viel destillirtes Wa... Alsdann durch Alkohol etc. in Balsam; auch kann man sie vorher ... Karmin etc. färben.

758. Golgis Methode mit Sublimat (Arch. Sc. Med. Torino 1878 p. ... Arch. Ital. Biol. Tome 4 1883 p. 92; Tome 7 1886 p. 35). Die Methode, im Prinzipe gleich der mit Höllenstein, beruht auf dem Här... mit Kaliumbichromat und dem Imprägniren mit Quecksilber. Zu... Härten nimmt man entweder Müllers Gemisch oder eine allmähl... stärkere Lösung von Kaliumbichromat (1—2½%), und zwar für d... Stücke von höchstens 1—2 ccm Grösse relativ viel, wechselt sie a... häufig, damit sie klar bleibt. (Man kann auch grosse Stücke, s... ganze Grosshirne, nehmen, muss dann aber die Flüssigkeit mehr... Male einspritzen, damit sie so rasch wie möglich ins Innere drin... Zum Härten genügen schon 6—8 Tage, besser sind 15—20, am bes... aber 20—30, obwohl auch mehrere Monate nicht schaden.

Nach der Härtung imprägnirt man die Objekte mit ei... ½%igen Lösung von Sublimat wenigstens 8—10 Tage lang ... Grosshirne 2 Monate und länger); man wechselt sie Anfangs jed... Tag, später so oft, wie sie noch gelb wird. Zuletzt sind die Objek... ganz entfärbt und sehen wie frisch aus. Man kann sie im Sublim... beliebig lange lassen. (Für das Studium des diffusen Nervennetzes i... Centralnervensystem thut man gut daran, sie in 1%igem Sublim... sehr lange, mitunter sogar 2 Jahre lang, liegen zu lassen; Golgi ... Rend. Ist. Lombardo Sc. Milano (2) Tomo 24 1891 p. 594, 656: Ze... Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 388).

Die Reaktion beginnt etwa dann, wenn die Objekte beinahe en... färbt sind; von da ab kann man alle Tage Schnitte machen und ... Belieben einschliessen. Zuvor jedoch muss man sie tüchtig mit Wa... waschen, damit keine schwarzen Niederschläge auftreten, kann s... nachher auch einige Minuten lang in ein photographisches Gold... legen und mit irgend einer sauren Karminlösung färben. Zum E... schluss scheint Glycerin besser zu sein als Balsam.

Das Resultat ist keine echte Färbung, sondern eine „anscheine... schwarze Reaktion", d. h. die Gewebe sind im durchfallenden Li... schwarz, im auffallenden weiss; Golgi meint, es bilde sich ein Präcip... und mache die Gewebe opak. Die Reaktion trifft 1) die Ganglienzell...

mit all ihren Fortsätzen; dabei treten auch die Kerne hervor, die mit Höllenstein nicht sichtbar werden; 2) die Bindegewebszellen, jedoch lange nicht so vollständig und scharf wie mit Höllenstein; 3) die Blutgefässe, besonders ihre Muskelzellen. Gute Resultate giebt die Methode übrigens nur an der Rinde der Hirnwindungen, kaum welche am Rückenmark und sehr dürftige am Kleinhirn. Im Ganzen zeigt sie zwar nicht mehr als die mit Höllenstein, ist ihr aber darin überlegen, dass sie stets ganz sicher arbeitet, dass die Präparate ohne Weiteres haltbar sind, und dass man sogar ganze Hemisphären danach behandeln kann.

S. auch Flatau in: Arch. Mikr. Anat. 45. Bd. 1895 p. 158. — Blochmann (Biol. Centralbl. 15. Bd. 1895 p. 14) empfiehlt die Methode für das Nervensystem der Cestoden.

759. Methode von Tal (Gazz. Ospitali Milano 1886 No. 68). Legt man die nach Golgis Quecksilbermethode behandelten Schnitte in eine Lösung von Natriumsulfit, so werden sie viel dunkler. Auch kann man sie noch mit Magdalaroth färben. — Ueber die Kombination mit Weigerts Färbung s. Pal (Wien. Med. Jahrb. 1886; Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 92).

760. Methode von Cox (Arch. Mikr. Anat. 37. Bd. 1891 p. 16). Cox härtet und imprägnirt zu gleicher Zeit: sein Gemisch besteht aus je 10 Theilen 5%iger Lösung von Kaliumbichromat und von Sublimat, 8 Theilen 5%iger Lösung von Kaliummonochromat und 15—20 Theilen Wasser. Es soll möglichst wenig sauer reagiren. Die Objekte legt man auf 2—3 Monate hinein. Die Schnitte müssen mit dem Gefriermikrotom gemacht werden, da sie den Alkohol nicht vertragen, kommen dann auf 2 Stunden in eine 5%ige Lösung von Natriumkarbonat, zuletzt in Wasser und durch absoluten Alkohol und ein Oel in Balsam, Dammar oder ein komplizirtes Gemisch von Harzen und Oelen. Unter dem Deckglase verderben sie aber.

761. Methode von Magini (Bull. Accad. Med. Roma 1886; Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 87). Man härtet kleine Stücke von 2—3 ccm Volumen wenigstens 2—3 Monate lang in Müllers Gemisch, wäscht sie mit Wasser gut aus und bringt sie auf 7—10 Tage in eine $^1/_{10}$—1%ige Lösung von Chlorzink, die alle Tage erneuert wird. Die Schnitte werden rasch mit Alkohol gewaschen und durch Kreosot in Dammar gebracht; man soll an ihnen den feineren Bau der Ganglienzellen und ihrer Fortsätze besser erkennen, als nach der Methode von Golgi.

762. Ueber die **Methode von Flechsig** (mit Rothholz) s. Arch. Anat. Phys. Phys. Abth. f. 1889 p. 537; Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 71.

763. Monti (Atti Accad. Lincei Rend. (4) Vol. 5 1889 Sem. 1 p. 705; Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 72) erhält eine braune Imprägnation durch Kaliumbichromat und Kupfersulfat. Die Methode scheint aber noch keine praktische Form angenommen zu haben.

764. Methode von Ziehen (Neur. Centralbl. 10. Jahrg. 1891 p. 6..; Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 385). Kleine Stücke legt man in e.. reichliche Menge eines Gemisches von je 1 Theil Sublimat u.. Goldchlorid in 200 Theilen Wasser auf wenigstens 3 Wochen (bess.. noch bis zu 5 Monaten), bis sie metallisch rothbraun geworden si.. Dann kittet man sie auf Kork, schneidet sie ohne Einbettung, behand.. die Schnitte entweder mit dem auf das Vierfache verdünnten Lugolsch.. Gemisch (oben § 76) oder mit verdünnter Jodtinktur, bis sie ordentl.. differenzirt sind, wäscht sie und bringt sie in Balsam. Es resulti.. eine bläulich graue Imprägnation sowohl der Nervenfasern als au.. der Ganglien- und Gliazellen und ihrer Fortsätze.

765. Methode von Azoulay (C. R. Soc. Biol. Paris (10) Tome 1 1.. p. 631). Man bringt Celloidinschnitte durch das Rückenmark mehrere M.. abwechselnd in eine 1%ige Lösung von Ammoniumvanadat und eine 5%.. von Tannin, wäscht sie nach kräftiger Färbung mit Wasser und mit 90%ig.. Alkohol und schliesst sie in Balsam ein.

766. Methode von Gerlach (Strickers Handbuch d. Gewebelehr.. p. 678). Man härtet kleine Stücke Rückenmark 15—20 Tage lang i.. 1—2% iger Lösung von Ammoniumbichromat und bringt die Schnitt.. auf 10—12 Stunden in eine mit Salzsäure ganz schwach angesäuerte Lösung von Goldchloridkalium (1:10000 Wasser), wäscht sie erst i.. schwacher Salzsäure (1:2000 bis 3000), dann in schwach saurem 60% igem Alkohol (1:1000) und bringt sie durch Nelkenöl in Balsam. Oder man schneidet mit dem Rasirmesser dünne Schnitte durch frische Rückenmark, legt sie auf 2—3 Tage in Ammoniumbichromat (1:5000 bis 10000), dann auf 24 Stunden in ganz schwaches Ammoniakkarmin, zerzupft sie und schliesst die isolirten Nervenzellen entweder in Glycerin oder nach dem Austrocknen in Balsam ein.

767. Upson (Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1891 p. 474) giebt zwei äusserst komplizirte Methoden zur Vergoldung von Schnitten an. Bei der einen verwendet er Eisenchlorid, bei der anderen Ammoniumvanadat.

768. Weigerts Methode zum Färben der Neuroglia des Menschen (Abh. Senckenb. Ges. Frankfurt 19. Bd. 1895 p. 199). Man bringt Stücke von höchstens 5 mm Dicke auf wenigstens 4 Tage in eine 10%ige Lösung von Formol und behandelt sie dann 4—5 Tage lang in einem Brütofen (oder wenigstens 8 Tage lang bei gewöhnlicher Temperatur) mit einem Gemisch von 5 Theilen Kupferacetat, $2^1/_2$ Theilen Chromalaun, 5 Theilen Essigsäure und 95 Theilen Wasser. (Man löse den

Chromalaun im Wasser durch tüchtiges Kochen und setze dann erst die Essigsäure und zuletzt das Kupfersalz zu, damit kein grüner Niederschlag entstehe.) Nun wasche man die Stücke mit Wasser, bette sie in Celloidin ein und schneide sie; die Schnitte lege man auf 10 Minuten in eine $^1/_3$ $^0/_0$ ige Lösung von Kaliumhypermanganat, wasche sie wieder und behandle sie 2—4 Stunden lang mit einer Lösung von Chromogen. (Dieser Stoff ist ein Naphthalinderivat und wird in den Höchster Farbwerken fabrizirt; zur Lösung nehme man 5 Theile Chromogen, eben so viel Ameisensäure und 95 Theile Wasser, filtrire sorgfältig und füge zu 90 ccm des Filtrates 10 ccm einer 10 $^0/_0$ igen Lösung von Natriumsulfit.) Nachher lege man sie über Nacht in eine 5 $^0/_0$ ige Lösung von Chromogen, wasche sie am folgenden Morgen gut aus und färbe sie in einer Modifikation des Fibrinfärbmittels von Weigert. (Diese bereitet man, indem man eine heiss gesättigte Lösung von Methylviolett in 70—80 $^0/_0$ igem Alkohol abkühlen lässt, klar abgiesst und mit 5 $^0/_0$ einer 5 $^0/_0$ igen Lösung von Oxalsäure in Wasser versetzt.) Schliesslich differenzire man die Schnitte in einem Gemisch gleicher Theile von Anilin und Xylol und bringe sie durch reines Xylol in Balsam. — S. auch § 899.

769. Säurerubin für Neuroglia. Kultschitzky (Anat. Anzeiger 8. Jahrg. 1893 p. 357) färbt Paraffinschnitte entweder 5—10 Sekunden lang mit einem Gemisch von 1 g Säurerubin, 400 ccm 2 $^0/_0$ iger Essigsäure und 400 ccm konzentr. wässeriger Pikrinsäurelösung oder wenigstens $^1/_2$ Stunde lang in einem Gemisch von 100 ccm 96 $^0/_0$ igem Alkohol und 3—5 ccm obigen Gemisches. Nach gründlichem Auswaschen in Alkohol sind die Ganglienzellen und Axencylinder gelbroth, während die Glia rothviolett ist. — Popow (Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 358) rühmt diese Färbung, verwendet aber entweder eine 1 $^0/_0$ ige wässerige Rubinlösung mit etwas Jodtinktur einige Sekunden lang und wäscht die Schnitte in absolutem Alkohol aus, oder eine 3 $^0/_0$ ige alkoholische Pikrinsäurelösung, die mit Rubin gesättigt ist, 5 - 10 Minuten lang.

Burckhardt (La Cellule Tome 12 1897 p. 364) ist ebenfalls der Ansicht, dass Säurerubin die Neuroglia präziser färbe als Säurefuchsin, und empfiehlt folgendes Gemisch: Pikrinsäure (1:300) 9 Theile, Säurerubin (konzentr. wässerige Lösung) 1 Theil, alsdann direkte Uebertragung in Alkohol. Zum Vorfärben der Kerne dient Methylviolett. Oder: die Kerne mit Fuchsin, und die Fasern mit Poiriers Blau oder Violett S in Pikrinsäure gelöst.

770. Methylenblau für das Centralnervensystem. Se. Meyer (Arch. Mikr. Anat. 46. Bd. 1895 p. 282) injicirt von einer 1 $^0/_0$ igen Lösung subcutan mehrere Male in Intervallen von 1 bis mehreren Stunden verhältnissmässig grosse Mengen (z. B. einem jungen Kaninchen 2 $\times$ 20 ccm), tödtet das Thier und bringt die Stücke direkt in gut gekühltes Gemisch von Bethe (oben § 294); sie bleiben darin bis zum folgenden Tage.

Gegenwärtig (ibid. 47. Bd. 1896 p. 735) injicirt er Lösungen von Methylenblau BX, die bei 37° C. gesättigt sind (enthalten 5—6%), und führt die ganze Menge in 1—2 Stunden ein, z. B. einer erwachsenen Katze 150 ccm.

Ramón y Cajal (Rev. Trimestr. Micr. Madrid Vol. 1 1896 p. 123; Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 92) färbt das Hirn von *Lepus cuniculus* mit Methylenblau durch „Propagation" oder „Diffusion", d. h. er streut auf Stücke von nur 2—3 mm Dicke in situ äusserst fein gepulvertes Methylenblau BB (oder bepinselt sie mit ganz konzentrirter Lösung), deckt die Schädelkapsel wieder darauf und nimmt die Scheiben erst nach $^1/_2$—$^3/_4$ Stunden heraus. Dann spült er sie in Normalsalzwasser rasch ab, fixirt sie mit Ammoniummolybdänat nach Bethe (ohne $H_2 O_2$) 2—3 Stunden lang, wäscht sie einige Minuten lang und härtet sie in einem Gemisch von 1 %iger Platinchloridlösung (1 Theil), Formol (40) und Wasser (60) 3—4 Stunden lang. Hierdurch wird zugleich die Farbe ganz unlöslich in Wasser, Glycerin etc. Weiterbehandlung kleinerer Objekte (Retina, Ganglien, Hirn von *Rana* etc.) mit Wasser, Lösung von Platinchlorid (1:300) in absolutem Alkohol, Xylol, Einbettung in Paraffin. Grössere Objekte werden nur mit einem Mantel von Paraffin umgeben und feucht geschnitten; die Schnitte werden mit Alkohol und Platinchlorid, dann mit reinem absol. Alkohol entwässert und durch Xylol oder Bergamottöl in Balsam gebracht.

Catois (Compt. Rend. Tome 124 1897 p. 124) injicirt in die Leibeshöhle von Fischen eine konzentrirte Lösung von Methylenblau, nimmt nach $^1/_2$ Stunde das Gehirn heraus, schneidet es in Stücke, legt diese auf $^1/_2$ Stunde in dieselbe Lösung und fixirt die Präparate wie gewöhnlich.

Retina.

771. Fixiren und Härten. Um Schnitte durch die Retina kleiner Augen zu machen, fixirt man am besten das ganze uneröffnete Auge in Osmiumsäuredämpfen, z. B. das von *Triton* 10 Minuten lang (Ranvier Traité 1 Ed. p. 954); dann schneidet man es im Aequator durch und legt die hintere Halbkugel auf einige Stunden in Drittelalkohol. Grössere Augen öffnet man besser vorher am Aequator und legt nur die hintere Halbkugel ein.

L. Johnson (in litt.) entfernt zunächst vom Auge eines erwachsenen Menschen Cornea nebst Linse, injicirt in den Glaskörper 3—6 Tropfen eines Gemisches von gleichen Theilen Eisessig und 2 %iger Lösung von Platinchlorid, legt dann das Auge auf 12 Stunden in das oben § 99 beschriebene Gemisch, wäscht es unter der Wasserleitung, hängt

es auf 2 Tage in ein grosses Glas voll 2½ %iger Lösung von Kaliumbichromat und bringt es schliesslich in Zeit von 5 Tagen allmählich von 20 %igem bis in absoluten Alkohol. Die Augen von Kindern hingegen, ferner von Kaninchen, Affen, Katzen, besonders aber von Embryonen fixirt er nur ungeöffnet: zuerst 2—3 Minuten lang über Dämpfen einer 2 %igen Osmiumsäure, die nahe bis zum Kochen erhitzt worden ist, dann auf 3—6 Stunden im Gemisch von Flemming, Hermann oder Johnson (oben § 99), dann im Kaliumbichromat; erst nach 2—3 Tagen darf man sie öffnen. — S. auch oben § 71 p. 44.

Ferner härtet man die Augen sehr gut in einem Gemisch von 4 Theilen Formol und 30 Theilen einer 1 %igen Lösung von Platinchlorid; sie werden zwar langsam hart, aber die Retina bleibt völlig ausgespannt, und auch die Fovea erhält sich gut, falls nur das Auge vorher (wie oben angegeben) über einer heissen Lösung von Osmiumsäure oder über fester Osmiumsäure, die man in einem Reagensglase erhitzt, gut fixirt worden ist. Dies ist nämlich absolut nöthig, und eine andere zuverlässige Behandlung als die mit Osmiumsäuredämpfen hat Johnson trotz mancher Versuche nicht entdeckt.

Leber (Münch. Med. Wochenschr. 41. Jahrg. 1894; Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1895 p. 256) bestätigt Hermanns Angaben (oben § 109) und empfiehlt zum Konserviren 1 Theil Formol und 9 Theile Wasser; haben die Augen einige Tage darin gelegen, so soll man sie ohne Schaden durchschneiden können. Die Retina sei wenigstens so gut konservirt wie in Müllers Gemisch. Dann könne man die Augen direkt in immer stärkeren Alkohol bringen, wobei der Glaskörper etwas schrumpfe, aber kaum so viel wie nach Müllers Gemisch.

772. Färben. Ramón y Cajal empfiehlt seine doppelte Imprägnation (oben p. 744). Kuhnt (Jena. Zeit. Naturw. 24. Bd. 1889 p. 177; Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 65) färbt nach Weigert und Pal (oben § 709), Dogiel mit Methylenblau (oben § 291, 293).

Schaffer (Sitz. Ber. Akad. Wien 99. Bd. 3. Abth. 1890 p. 110; Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 227) behandelt die Schnitte zuerst einige Stunden lang mit 1 %iger Chromsäure, wäscht sie nur kurz mit Wasser, bringt sie dann auf 20 Stunden in Kultschitzkys Hämatoxylin (oben § 711) und differenzirt sie 12 Stunden lang in Weigerts Lösung von rothem Blutlaugensalz (oben § 707).

W. Krause (unten § 774) behandelt die frische Retina mit einer 1 %igen Lösung von Eisen- oder Vanadiumchlorid und nachher mit einer 2 %igen Lösung von Gerb- oder Pyrogallussäure. So färben sich nur die Körnerschichten und die Kerne der Ganglienzellen. Die Elemente der anderen Schichten mag man mit Säurefuchsin oder einem anderen Theerfarbstoff färben. — Lennox (Arch.

Ophth. 32. Bd. 1. Heft; Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 408) färbt mit Hämatoxylin nach Weigert; Cuccati (Mem. Accad. Bologna (4) Tomo 7 1887 p. 265) mit konzentrirter Lösung von Säurefuchsin und schliesst in Balsam ein.

S. auch Bernheimer (Sitz. Ber. Akad. Wien 90. Bd. 3. Abth. 1884 p. 137) und Ramón y Cajal (Rev. trimestr. Hist. Tomo 1 1888 p. 1 und Anat. Anzeig. 4. Jahrg. 1889 p. 111; Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 373).

Colucci (Giorn. Ass. Med. Natural. Napoli Anno 5 1894 p. 5; Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1895 p. 87) empfiehlt vor Allem Paladinos Imprägnation mit Jodpalladium (oben § 721).

Ueber das Bleichen der Retina s. § 573—575 und 705.

773. Schneiden. Einige Forscher haben Celloidin empfohlen, indessen sehe ich nicht ein, warum man nicht Paraffin wählen soll. Die Schnitte schliesst man in Dammar oder nach Flemming in Glycerin ein.

774. Maceriren. Man kann zunächst in $^1/_5$—$^1/_2$ %iger Osmiumsäure fixiren und dann 2—3 Tage lang in $^1/_{50}$ %iger Chromsäure (M. Schultze) oder in Jodserum (M. Schultze), in schwachem Alkohol (Landolt), in Müllers Gemisch oder endlich in Wasser (Ranvier, Traité 1. Ed. p. 957) maceriren. Thin (Journ. Anat. Phys. London Vol. 14 1879 p. 139) fixirt 36—48 Stunden lang in Drittelalkohol oder in 25 %igem Alkohol, färbt dann und zerzupft. — Schiefferdecker macerirt die frische Retina einige Tage lang in seinem Methylgemisch (oben § 537). — W. Krause (Internation. Monatschr. Anat. Hist. 1. Bd. 1884 p. 225; Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 140, 396) behandelt sie mehrere Tage lang mit einer 10 %igen Lösung von Chloralhydrat. Barrett (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 26 1886 p. 607) findet, dass sich Stäbchen und Zapfen auf diese Weise vorzüglich halten.

Inneres Ohr.

775. Schwalbe (Beitr. Phys. Festschrift f. Ludwig 1887; Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 90) fixirt die Schnecke von *Cavia* 8 bis 10 Stunden lang in Flemmings Gemisch, wäscht sie in Wasser, entkalkt sie 24 Stunden lang in 1 %iger Salzsäure, säuert sie aus und bringt sie zum Schneiden in Paraffin. — S. auch § 566 Ferreri.

Prenant (Internation. Monatschr. Anat. Phys. 9. Bd. 1892 p. 28; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1893 p. 379) öffnet die Schnecke in Hermanns oder Flemmings Gemisch, fixirt sie 4—5 Stunden lang darin, nimmt zum Entkalken, das er lieber ganz vermeidet, 1 %ige Lösung von Palladiumchlorid (nach P. Meyer 1876) und färbt die Paraffinschnitte mit Safranin oder mit Methylviolett B, oder mit Anilingrün und Orange.

oder mit Eosin und Hämatoxylin nach Renaut. Zur Isolirung der Stria vascularis legt er die Schnecke auf 1 Tag in 1 %ige, dann auf 4—5 Tage in $^1/_{10}$ %ige Osmiumsäure; die Stria lässt sich dann im Zusammenhang abheben.

776. Andere Methoden. Waldeyer (Strickers Handbuch p. 958) entkalkt entweder in „Chlorpalladium (0,001 pc.) mit $^1/_{10}$ Theil Salzsäure“ oder in $^1/_4$—1 %iger Chromsäure. Pritchard (Journ. R. Micr. Soc. London 1876 p. 211) entkalkt in 1 %iger Salpetersäure.

Lavdowsky (Arch. Mikr. Anat. 12. Bd. 1876 p. 497) behandelt die frische Schnecke mit 1 %iger Lösung von Höllenstein, wäscht sie 10 Minuten lang in Wasser mit etwas $^1/_2$- oder 1 %iger Osmiumsäure und schliesst sie in Glycerin ein.

S. ferner Flesch (Arch. Mikr. Anat. 15. Bd. 1878 p. 300) und Tafani (Arch. Ital. Biol. Tome 6 1884 p. 208); Politzer, Anat. u. hist. Zergliederung d. menschl. Gehörorganes, Stuttgart 1889 (Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 364); Eichler (Abh. Math. Physik. Cl. Sächs. Ges. Wiss. 18. Bd. 1892 p. 311; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1893 p. 380): giebt genaue Anleitung zur Injektion der Blutgefässe; Siebenmann, Blutgefässe im Labyrinthe d. menschl. Ohres, Wiesbaden 1894 (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 386).

Elektrische Organe.

777. Torpedo. Ballowitz (Arch. Mikr. Anat. 42. Bd. 1893 p. 460 etc.) behandelt die frischen Säulen vorzugsweise nach Golgi mit Höllenstein, zur Kontrole auch mit 1 %iger Osmiumsäure (1—2 Tage lang, dann zerzupft und direkt in Wasser untersucht oder mit Gentianaviolett etc. gefärbt). Die Fixirung mit Flemmings Gemisch, Chlorpalladium und Salpetersäure von 3—5 % giebt nicht so gute Resultate; die Vergoldung und namentlich die Versilberung des frischen Gewebes sind ebenfalls nicht geeignet. (B. bespricht die älteren Methoden ausführlich.)

Iwanzoff (Bull. Soc. Natural. Moscou (2) Tome 8 1895 p. 407) untersucht die Platten entweder in der Cerebrospinalflüssigkeit des Thieres oder fixirt sie besonders gut, indem er zunächst Osmiumsäure von $^1/_2$—2 % interstitiell einspritzt und die nach einigen Minuten herausgeschnittenen Säulen in 2 %igem Kaliumbichromat (oder Ammoniumbichromat oder Müllers Gemisch) härtet, dann nach dem Abspülen mit Wasser direkt in einer wässerigen oder alkoholischen Lösung von Hämatoxylin färbt und eventuell in Paraffin schneidet. (J. hat auch sehr viele andere Methoden probirt, s. hierüber und über die seiner Vorgänger das Original.)

778. Raja. Iwanzoff (ibid. Tome 9 1895 p. 74) fixirt das Organ im Schwanze von *Raja* hauptsächlich mit Flemmings Gemisch, färbt es vor dem Schneiden mit Hämacalcium und Eosin und untersucht es in Balsam oder besser in Kaliumacetat.

Ballowitz (Anat. Hefte 1. Abth. 7. Bd. 1897 p. 285) verwendet zur Untersuchung des elektrischen Organs im Schwanze von *Raja* alle gebräuchlichen Methoden. Fixirung am besten in konzentrirter Lösung von Sublimat in Seewasser oder 0,6 $^0/_0$ igem Salzwasser, oder auch in Flemmings Gemisch. Die Schnitte werden besser in Wasser untersucht, da Oel und Balsam zu sehr aufhellen. Die Golgische Methode leistet viel.

31. Kapitel.

Einige andere histologische Methoden.

Bindegewebe.

779. Bindegewebe. S. Mayer (Sitz. Ber. Akad. Wien 85. Bd. 3. Abth. 1882 p. 69) empfiehlt zum raschen und kräftigen Färben frischen Gewebes seine Lösung von Methylviolett B (oben § 329); auch die elastischen Fasern und glatten Muskeln färben sich damit, aber anders.

Ferner Flemming (Internation. Beitr. Wiss. Med. 1. Bd. 1891 p. 213; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 225) über die Entwicklung der Bindegewebfasern. Ranviers künstliche Oedeme zum Studium des areolären Gewebes s. in seinem Traité 1. Ed. p. 329.

Freeborn (Amer. Month. Micr. Journ. Vol. 9 1888 p. 231; Journ. R. Micr. Soc. London 1889 p. 305) färbt Schnitte 3 Minuten lang mit Pikronigrosin (10 ccm 1%iger wässeriger Lösung von Nigrosin und 90 ccm konzentrirter wässeriger Lösung von Pikrinsäure), wäscht sie mit Wasser und bringt sie in Balsam: Bindegewebfasern hellblau, Kerne schwärzlich, alles Uebrige grünlich gelb.

780. Bindegeweb- und Plasmazellen. Löwenthal (Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 309) fixirt kleine Stücke vom subcutanen Gewebe zwischen den Schulterblättern der weissen Ratte 24 Stunden lang im Gemisch von Golgi (oben § 740), wäscht sie gut aus, legt sie auf 36—48 Stunden in Alkohol von 70% und färbt sie mit Delafields Hämatoxylin oder Alaunkarmin. — Auch Merkel (Verh. Anat. Ges. 9. Vers. 1895 p. 42) und Spuler (Anat. Hefte 7. Bd. 1896 p. 130) fixiren mit diesem Gemisch. Spuler färbt mit „Alauncampeche“ (oben § 243), Eisenhämatoxylin etc.

781. Färben der Fibrillen. Benecke (Verh. Anat. Ges. 7. Vers. 1893 p. 165; Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 79) färbt sie fast genau so wie Kromayer (oben § 643) die Plasmafasern.

782. Färben des Collagens. Unna (Monatsh. Prakt. Derm. 18. Bd. 1894 p. 509; Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 518) zieht der Methode

von Benecke (§ 781) die beiden folgenden vor, wenn man nicht nur die Collagenfasern, sondern auch die Grundsubstanz und die übrigen Elemente im Präparate gefärbt haben will.

a) Die Methode mit Orceïn. Schnitte von Material aus Alkohol färbt man in Grüblers starker Lösung von polychromem Methylenblau (oben § 286), bringt sie auf $^1/_4$ Stunde in eine neutrale 1 % ige Lösung von Orceïn in absolutem Alkohol, wäscht sie mit Alkohol und führt sie durch Bergamottöl in Balsam über: Kerne blau, collagene Grundsubstanz dunkelroth, Körner in den Mastzellen karminroth, Plasmazellen blau.

b) Die Methode mit Sulfosalzen: 1) man färbt die Schnitte 5—10 Minuten lang in einer 2 % igen wässerigen Lösung von Säurefuchsin, spült sie ab, behandelt sie 1—2 Minuten lang mit konzentr. wässeriger Lösung von Pikrinsäure, entwässert sie 2 Minuten lang in konzentrirter Lösung von Pikrinsäure in absolutem Alkohol, wäscht sie mit Alkohol ab und bringt sie in Balsam. Oder 2) man färbt sie 20 Sekunden lang in Wasserblau (1 % iger wässeriger Lösung), wäscht sie ab, färbt sie 5 Minuten lang in Safranin (1 % iger wässeriger Lösung), wäscht sie wieder, legt sie in absoluten Alkohol, bis sie wieder blau werden, und bringt sie in Balsam.

783. Fettzellen. Flemming (Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 39, 178) macht darauf aufmerksam, dass osmirtes Fett sich in Terpentinöl (Dekhuyzen), Aether und Kreosot (P. Mayer) sehr rasch, langsam dagegen in Xylol, Nelkenöl oder Chloroform löse. Konservirt man daher Fettgewebe mit einem Osmiumgemisch, färbt es mit Safranin oder Gentianaviolett und schafft das Fett durch Terpentinöl fort, so erhält man gute Präparate zum Studium der Fettzellen. Will man hingegen das Fett nicht extrahirt haben, so nehme man zum Einbetten in Paraffin nur Chloroform (oder Nelkenöl), zum Einschluss Xylolbalsam. Flemming osmirt in 1—2 % iger Osmiumsäure 12—24 Stunden lang bei Abschluss des Lichtes und wäscht dann lange mit Wasser aus. Das Fett wird erst in Alkohol schwarz.

784. Fett. Daddi (Arch. Ital. Biol. Tome 26 1896 p. 143) färbt Fett in den Geweben mit konzentrirter Lösung von Sudan III ($C_{22}H_{16}N_4O$) in Alkohol, indem er Stücke der womöglich mit Müllers Gemisch konservirten Gewebe 5—10 Minuten lang hineinlegt, eben so lang mit Alkohol auswäscht, mit Fliesspapier abtrocknet und in Glycerin untersucht. Die kleinen Fetttropfen sind gelb, die grösseren orangeroth, weiter färbt sich Nichts. Die Schnitte sind aus freier Hand oder mit dem Gefriermikrotom zu machen, um das Fett nicht auszuziehen. Das Myelin der Nerven wird nur ganz hellgelb.

785. Mastzellen. Ehrlich (Arch. Mikr. Anat. 12. Bd. 1876 p. 263) färbt die nur in starkem Alkohol gehärteten Gewebe wenigstens 12 Stunden lang mit einer beinahe konzentrirten Lösung von Dahlia in einem Gemisch aus 1 Theil Eisessig, 4 Theilen absolutem Alkohol und 8 Theilen Wasser. Dann differenzirt er sie in absolutem Alkohol und schliesst sie in Terpentinkolophonium ein. Aehnlich kann man auch Lösungen von Primula, Jodviolett, Purpurin, Safranin, Fuchsin und Methylviolett (dies ist das beste) in Wasser mit $7\,{}^1/_2\,{}^0/_0$ Essigsäure verwenden.

Westphal (Ueber Mastzellen. Dissert. 1880) färbt in den Mastzellen ausser den Körnern die Kerne durch folgendes Gemisch: Alaunkarmin, Glycerin und „stark dahliahaltiger“ absoluter Alkohol je 100, Eisessig 20 ccm. Färbung 24 Stunden lang.

786. Plasmazellen. Nordmann (Beitr. z. Kenntn. d. Mastzellen, Dissert. Helmstedt 1884) färbt die Schnitte einige Minuten lang mit konzentrirter wässeriger Lösung von Vesuvin mit 4—5 ${}^0/_0$ Salzsäure und bringt sie durch absoluten Alkohol in Balsam. Er giebt auch eine ausführliche Schilderung der mikrochemischen Reaktionen der Körnerzellen.

787. Plasmazellen und Mastzellen. Unna (Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1892 p. 482) färbt die Schnitte mit polychromem Methylenblau.

a) Plasmazellen. Eine Lösung von 1 Theil Methylenblau, ${}^1/_{20}$ Theil Aetzkali und 100 Theile Wasser verdünnt man mit dem 10—100fachen an Anilinwasser und färbt damit Material aus Alkohol (allenfalls aus Sublimat und Alkohol, nicht aber aus Chromgemischen) ${}^1/_2$ Stunde lang bis über Nacht, entwässert es rasch in absolutem Alkohol, differenzirt es in Kreosol, wäscht es mit Xylol ab und bringt es in Balsam.

b) Gewebe und Plasmazellen. Man dampft eine Lösung von je 1 Theil Methylenblau und Kaliumkarbonat in 20 Theilen Alkohol und 100 Theilen Wasser auf dem Wasserbade langsam bis auf 100 Theile ein und benutzt das an Methylenviolett reich gewordene Gemisch entweder direkt oder nach Verdünnung mit gleich viel Anilinwasser. Differenzirung mit Glycol, Styron oder Kreosol.

c) Mastzellen und Plasmazellen. Eine Lösung von je 1 Theil Methylenblau und Kaliumkarbonat (oder dem Natron- oder Ammoniaksalz) in 100 Theilen Wasser (Aq. carbolisata, chloroforma) verdünnt man etwa auf das 100fache, färbt darin die Schnitte langsam,

behandelt sie mit Alkohol von 70—80 %, differenzirt sie in Styron und bringt sie durch Bergamottöl oder Xylol in Balsam. Die Körner in den Mastzellen färben sich roth, da sich im Farbbade Methylenroth gebildet hat. Plasmazellen blau.

S. ferner Unna (Monatsh. Prakt. Derm. 12. Bd. 1891 p. 296 und 19. Bd. 1894 p. 225; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 92 und 12. Bd. 1895 p. 58), van der Spek & Unna (ibid. 13. Bd. 1891 p. 364; ibid. 9. Bd. 1892 p. 89).

788. Plasmazellen und Mastzellen. Bergonzini (Anat. Anzeiger 6. Jahrg. 1891 p. 595) färbt Schnitte von Material aus Alkohol oder Sublimat 3—4 Minuten lang in einem Gemisch von $^2/_{10}$ %igen Lösungen von Säurefuchsin (1 Vol.), Methylgrün (2 Vol.) und Goldorange (2 Vol.), wäscht sie 1—2 Minuten lang in Wasser, 2 Minuten lang in absol. Alkohol und bringt sie durch Kreosot (oder Bergamottöl) und Terpentinöl in Balsam. Man kann auch statt des Goldorange, von der eine Sorte das Methylgrün ausfällt, Orange G nehmen, sodass man ähnlich wie nach Ehrlich-Biondi färbt.

789. Plasmazellen. Jadassohn (Arch. Derm. Syph. Ergänz. Heft 1 1892 p. 58; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 226) überfärbt kurze Zeit mit Thionin in „stark alkalischer (1:2000) oder Boraxlösung“ und wäscht mit angesäuertem Wasser aus. S. auch Marschalko (Arch. Derm. Syph. 30. Bd. 1895 p. 3; Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1895 p. 64).

790. Clasmatocyten von Ranvier (Compt. Rend. Tome 110 1890 p. 165). Man spannt das Mesenterium von Batrachiern oder ein Stück des Netzes von Säugethieren auf einem Objektträger gut aus, lässt einige Tropfen 1 %iger Osmiumsäure darauf fallen, wäscht nach 1 bis 2 Minuten mit Wasser aus und färbt mit einer auf das Zehnfache verdünnten gesättigten wässerigen Lösung von Methylviolett 5 B. In Glycerin ist die Färbung nicht haltbar, vielleicht aber in dem Gemisch von Brun (oben § 420).

791. Elastisches Gewebe. Die elastischen Fasern sind durch ihre grosse Verwandtschaft zur Osmiumsäure — sie färben sich damit viel rascher als die meisten übrigen Gewebe — und durch ihre Unveränderlichkeit in Natron- oder Kalilauge ausgezeichnet. Auch zu einigen Theerfarben, besonders Viktoriablau, zeigen sie eine grosse Neigung.

Eine Uebersicht über die älteren Methoden von Balzer, Unna, Lustgarten und Herxheimer giebt G. Martinotti (Zeit. Wiss. Mikr.

4. Bd. 1887 p. 31). Die Methode von Lustgarten s. oben p. 172; er verwendet „Viktoriablau 4 B“, was vielleicht wichtig ist. G. Martinotti fixirt das Gewebe in $^1/_5$ $^0/_0$iger Chromsäure, wäscht es aus, färbt es 48 Stunden lang in Safranin (5 g auf 100 ccm absol. Alk. und 200 ccm Wasser), wäscht es, entwässert es und schliesst es durch Nelkenöl in Balsam ein. Die elastischen Fasern färben sich tief schwarz.

In einem Brütofen geht die Färbung rascher vor sich (Griesbach in: Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 442). Nach Ferria (ibid. 5. Bd. 1888 p. 342) werden die Präparate deutlicher, wenn man die Schnitte 24 Stunden in Alkohol lässt oder kurz mit ganz schwacher Lösung von Aetzkali in Alkohol behandelt, weil so die anderen Gewebe im Präparate mehr entfärbt werden.

Mibelli (Monit. Z. Ital. Anno 1 1890 p. 17; Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 225) giebt eine andere Methode mit Safranin an, die aber zu ängstliches Aufpassen auf allerlei Kleinigkeiten zu erfordern scheint.

Ueber das elastische Gewebe in der Haut s. Passarge & Krosing (Dermat. Stud. 18. Bd. 1894), über die Färbung und Isolirung der elastischen Fasern Agababow (Arch. Mikr. Anat. 50. Bd. 1897 p. 566 ff.).

C. Martinotti (Arch. Ital. Biol. Tome 11 1889 p. 257; Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 521) legt von frischem Gewebe (Haut, Darm, Muskeln etc.) kleine Stücke von 2—3 ccm auf 24 Stunden in eine 2 $^0/_0$ige Lösung von Arsensäure (für Knochen nimmt er eine 4 $^0/_0$ige bei 50° C., damit sie zugleich entkalke), bringt sie dann auf 5 bis 15 Minuten in Müllers Gemisch und zuletzt jedes Stück für sich in ein Gemisch von 2 g Höllenstein, 3 ccm Wasser und 15—20 ccm Glycerin; nach 24 Stunden wird das Stück untergesunken sein und darf noch 2 Tage in der Flüssigkeit bleiben. Nachher wird es mit Wasser rasch abgespült und in häufig gewechseltem Alkohol gehärtet. Die Schnitte werden unter Alkohol gemacht, einen Augenblick in Salzwasser (von 0,75 $^0/_0$) getaucht, sofort in absol. Alkohol entwässert und durch Kreosot in Balsam eingeschlossen. Starkes Licht ist bei allen Operationen zu vermeiden.

Loisel (Journ. Anat. Phys. Paris 33. Année 1897 p. 134) fixirt zum Studium der Entwicklung der elastischen Fasern bei Embryonen von Säugern und Selachiern die Gewebe ja nicht mit sauren Gemischen, sondern mit „sublimé faible“ oder Müllers Gemisch, schneidet sie in Paraffin und färbt sie mit Orceïn und Salzsäure in alkoholischer Lösung (1:200). — S. auch Gardner in: Biol. Centralbl. 17. Bd. 1897 p. 398 (Fixirung in Müllers Gemisch; Färbung mit Fuchsin in salpetersaurer Lösung nach Unna, Entfärbung mit 25 $^0/_0$iger Kalilauge oder

mit 25 %iger Salpetersäure. Oder Fixirung in einem frischen Gemisch von 4 Theilen konzentr. Lösung von Kupfersulfat und 1 Theil 1 %iger Osmiumsäure „mit nachfolgender Bearbeitung der Gewebe mittels Gallussäure“).

792. Unnas neuere Methode mit Orceïn (Monatsh. Prakt. Derm. 19. Bd. 1894 p. 397; Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1895 p. 240). Man löst 1 Theil von Grüblers Orceïn in 100 Theilen absol. Alkohol, fügt 1 Theil Salzsäure hinzu, übergiesst mit dieser Lösung die Schnitte in einer Porzellanschale, bis sie gerade bedeckt sind, und erwärmt die Schale auf 30° C. Nach 10—15 Minuten ist die Farbe durch Verdunstung ganz dick geworden; dann spült man die Schnitte in Alkohol ordentlich ab und bringt sie in Balsam. Elastin dunkel, Collagen hell braun.

Unnas ältere Methode s. in: Monatsh. Prakt. Derm. 12. Bd. 1891 p. 394 (Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 94); ferner Zenthöfer in: Unnas Derm. Stud. 14. Heft 1892 (Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1893 p. 509); Köppen (ibid. 6. Bd. 1890 p. 473; 7. Bd. 1890 p. 22); Burci (Atti Soc. Toscana Sc. N. Tomo 7 1891 p. 251; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1891 p. 831, f. 1892 p. 292); Hansen (Arch. Path. Anat. 137. Bd. 1894 p. 25; Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 383); Kultschitzky (Arch. Mikr. Anat. 46. Bd. 1895 p. 673); Günther (Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 230); Schiefferdecker (ibid. p. 302).

Triepel (Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 31) färbt kleine Objekte, die in Alkohol fixirt worden sind, in toto mit einer konzentrirten Lösung von Orceïn (1 g auf 140 ccm 70%igen Alkohol und 40 Tropfen konzentr. Salzsäure) 24 Stunden lang, wäscht sie mit saurem 70%igem Alkohol (1% HCl) kurze Zeit aus und bettet sie in Paraffin ein.

793. Ueber die Gitterfasern in Leber und Milz s. unten § 817.

Zähne, Knochen und Knorpel.

794. Allgemeines. Eine sehr ins Einzelne gehende Uebersicht über die gesammte Technik der Untersuchung giebt J. Schaffer (Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 167—211).

O. Schultze (Verh. Anat. Ges. 11. Vers. 1897 p. 3) macht zum Studium der Skelettbildung die konservirten Embryonen mit Kalilauge und Glycerin durchsichtig.

795. Isolirung der Skeletttheile. Thilo (Anat. Anzeiger 12. Bd. 1896 p. 244) bringt zur Isolirung des knorpligen oder knöchernen Skelettes die Fische zunächst auf 24 Stunden in Wasser, dann auf eine bis mehrere Wochen in verdünnte Schwefelsäure (1 Vol. englische Säure und 10 Vol. Wasser), isolirt dann das Skelett und entsäuert es

erst in Wasser, dann in einer konzentr. Lösung von Barythydrat oder einer Sodalösung (1:30). Um den Kalk in den Knochen gar nicht angegriffen zu haben, verdünnt man die Schwefelsäure statt mit Wasser mit 70—80 %igem Alkohol.

796. Schleifen der Knochen und Zähne ohne Weichtheile. Ranvier (Traité 1. Ed. p. 297) giebt einige wichtige Maassregeln bei der Anfertigung von Schliffen an. Damit sich die Knochen nicht mit Fett infiltriren können, muss man sie sofort nach der Entfernung der Weichtheile in Wasser legen und noch nass in quere Stücke zersägen. Ferner muss man das Mark mit einem Wasserstrahl herausspülen (spongiöse Knochen setzt man durch einen Kautschukschlauch an die Wasserleitung an) und nun die Knochen einige Monate lang unter häufigem Erneuern des Wassers maceriren lassen. Sind so alle Weichtheile völlig zerstört, so lässt man die Knochen trocknen; sie müssen dann weiss sein wie Elfenbein und an den Schnittflächen gleichmässig matt aussehen. Nun sägt man eine dünne Scheibe aus und schleift sie auf einem Stück Bimstein (dies werde in der Richtung der Fasern aus kompaktem Steine geschnitten) nass mit dem Finger auf beiden Seiten glatt; dann nimmt man einen anderen Stein zu Hülfe und schleift sie zwischen beiden weiter. Ist sie endlich beinahe durchsichtig, so polirt man sie mit dem Finger auf einem nassen Abziehstein oder lithographischen Stein. Spongiöse Knochen tränkt man mit Gummi arab. und trocknet sie vor dem Abschleifen. S. übrigens die Methode von Koch mit Copal, oben p. 109, und die von Ehrenbaum mit Kolophonium, oben p. 111.

Schaffer (l. c.) nimmt zum Schleifen und Poliren verschiedene Schleifsteine: der gröbste ist ein künstlicher Schmirgelstein, der feinste Lithographirschiefer. Zerbrechliche Knochen werden einfach in einen Tropfen Siegellack eingehüllt und damit geschliffen, noch besser aber in dicken Kanadabalsam unter vorsichtigem Erwärmen eingeschmolzen, mit der Laubsäge zerschnitten und nun geschliffen.

White (Journ. R. Micr. Soc. London f. 1891 p. 307) sägt oder schleift Scheiben von Knochen oder Zähnen ziemlich dünn, legt sie auf wenigstens 24 Stunden in Aether, dann auf 2—3 Tage in ein dünnflüssiges Kollodium, worin Fuchsin aufgelöst ist, endlich in Alkohol zur Härtung des Kollodiums. Darauf schleift er sie zwischen zwei Platten von altem mattem Glase mit Wasser und Bimstein ganz dünn und schliesst sie bei möglichst geringer Erwärmung in dicken Balsam oder Styrax ein. Alle Lücken, Kanäle etc. sind dann mit dem gefärbten Kollodium angefüllt.

Ruprecht (Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 21) feilt zunächst die Sägeschnitte auf 0.3 mm Dicke ab, legt sie in Aether, erhitzt sie trocken auf einer Platte, lässt sie noch heiss in Aether und von hier aus in eine siedende konzentr. Lösung von Fuchsin in absol. Alkohol gleiten, nach 5 Minuten das Färbbad unter 34° C. abkühlen und wieder bei 70° mit den Schnitten zur Trockne eindampfen. Dann kratzt er unter sorgsamster Vermeidung aller Feuchtigkeit das Fuchsin aussen von den Schliffen ab und schleift diese zwischen zwei matten Gläsern mit Bimsteinpulver, wasserfreiem Benzin und etwas Vaselin, ferner auf einem Arcansasstein, polirt sie zwischen Schreibpapier und schliesst sie in Benzolkolophonium ein. — Aehnlich verfährt Zimmermann (Verh. Anat. Ges. 3. Vers. 1890 p. 142).

Matschinsky (Arch. Mikr. Anat. 39. Bd. 1892 p. 151; 46. Bd. 1895 p. 290) tränkt den Knochen mit Gummilösung, härtet diese in 95%igem Alkohol, trocknet sie an der Luft und schleift trocken.

797. Schleifen der Zähne und Knochen mit den Weichtheilen. Weil (Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 200) legt die mit einer Laubsäge in 2 oder 3 Stücke zerschnittenen frischen Zähne zum Fixiren der Weichtheile auf mehrere Stunden in konzentrirte Sublimatlösung, bringt sie durch Wasser und 30—90 %igen Alkohol (mit etwas Jod) in absoluten Alkohol, färbt sie mit Boraxkarmin, führt sie durch Alkohol, ein ätherisches Oel und Xylol in Chloroform über, bringt sie in eine dünne Lösung von hartem Kanadabalsam in Chloroform, konzentrirt diese nach 24 Stunden durch Zusatz von Balsam und verdampft auf dem Wasserbade unter allmählichem Steigern der Wärme (bis auf 90°) alles Chloroform. Dann schleift er wie gewöhnlich.

Röse (Anat. Anzeiger 7. Bd. 1892 p. 512), der Kochs Methode (oben § 175) auf Zähne anwendet, durchtränkt den Zahn sehr langsam und sorgfältig erst mit einem Gemisch von Alkohol und Cedernöl, dann mit reinem Cedernöl, darauf mit einem Gemisch von Cedernöl und Xylol oder Chloroform, endlich mit reinem Xylol oder Chloroform und bringt ihn nun in eine dünne Lösung von Dammar in Xylol oder Chloroform, die er im Sandbade allmählich zur Trockne verdampft. Ferner (ibid. 14. Bd. 1897 p. 54) behandelt er Schliffe von den in Alkohol aufbewahrten Zähnen oder Knochen nach Golgi (je 24 Stunden lang in $^1/_2$%iger Lösung von Kaliummonochromat und $^3/_4$%iger Lösung von Höllenstein), polirt sie und schliesst sie trocken in harten Balsam ein. Alle organische Substanz ist dann geschwärzt.

Nach Nealey (Amer. Month. Micr. Journ. Vol. 5 1884 p. 142; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1885 p. 348) kann man ganz frische Stücke von Knochen oder Zähnen mit Schmirgel auf einer Drehscheibe für Zahnärzte schleifen und erhält so in $^1/_2$ Stunde gute Schliffe mit den Weichtheilen in situ.

798. Schneiden der unentkalkten Zähne und Knochen. Hopewell-Smith (Journ. Brit. Dent. Ass. Vol. 11 1890 p. 310; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1890 p. 529) empfiehlt zur Darstellung der Odontoblasten, den Unterkiefer eines Embryos von Hund oder Katze in Müllers Gemisch zu fixiren, dann in Alkohol zu bringen und schliesslich mit dem Gefriermikrotom zu schneiden, dessen Messer durch das dünne halb verkalkte Dentin leicht durchgeht.

799. Schneiden der entkalkten Zähne und Knochen. Flemming (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 47) macht aus freier Hand Schnitte durch entkalkte Knochen, legt sie auf dem Objektträger in einen Wassertropfen, trocknet sie mit Löschpapier ab, dekt einen anderen Objektträger darauf und bringt sie so auf $^1/_2$ Stunde in Alkohol, damit sie sich nicht rollen können, später in absoluten Alkohol, endlich wieder auf einen Objektträger und, mit Löschpapier und einem schweren Glase bedeckt, 1 Tag lang zum Trocknen an die Luft oder in die Wärme. Sind sie auf diese Weise flach getrocknet, so schafft er sie auf einen Objektträger mit einem flach ausgebreiteten Tropfen Kanadabalsam, legt ein ähnlich präparirtes Deckglas auf, erwärmt das Präparat etwas und drückt das Deckglas fest an. Die Lakunen etc. sind dann eben so gut mit Luft gefüllt wie auf Schliffen. (Schaffer, l. c., findet aber die Form der Lakunen und Kanälchen etwas verändert.)

Kölliker (Zeit. Wiss. Z. 44. Bd. 1886 p. 662) behandelt zur Demonstration der Sharpeyschen Fasern die Schnitte so lange mit konzentr. Essigsäure, bis sie durchsichtig sind, bringt sie dann auf $^1/_4$—1 Minute in eine konzentrirte Lösung von Indigkarmin, wäscht sie mit Wasser und schliesst sie in Glycerin oder Balsam ein. In gelungenen Präparaten sind die Fasern roth, die Grundsubstanz blau.

Zachariadès (Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1894 p. 447) entkalkt den Knochen mit Pikrinsäure, wäscht ihn gründlich aus, bringt ihn in Alkohol und schneidet ihn. Die Schnitte behandelt er auf dem Objektträger einige Sekunden lang mit 1%iger Osmiumsäure und färbt sie entweder 24 Stunden lang in einer schwachen wässerigen Lösung von Chinolinblau oder einige Minuten lang in einer konzentr. wässerigen Lösung von Safranin. Dann behandelt er sie unter Erwärmung mit 40%iger Kalilauge, bis sie sich flach ausstrecken, wäscht sie sorgfältig aus und untersucht sie. Die Safraninfärbung hält sich in Glycerin, worin etwas Safranin gelöst ist.

Vivante (Internation. Monatschr. Anat. Phys. 9. Bd. 1892 p. 394; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1893 p. 351) legt 3—4 mm dicke Stücke des Stirnknochens von 4—6 Monate alten Kälbern auf 8 Tage in Müllers Gemisch und behandelt sie dann mit Höllenstein nach Golgi weiter. Nach der Versilberung legt er sie zum Entkalken auf 20 Tage in Ebners Gemisch (oben § 556), wäscht sie gut mit Wasser und Jod aus und bettet sie in Paraffin ein. Oder er fixirt sie 5—6 Tage lang in Flemmings Gemisch, entkalkt sie nach Ebner, wäscht sie

bringt sie in Paraffin, färbt die Schnitte 1 Stunde lang in einer $^1/_5\,^0/_0$igen Lösung von Chinolinblau (oben § 320), wäscht sie in $50\,^0/_0$igem Alkohol, dann in Wasser aus, trocknet sie bei 40^0 C. und bringt sie durch Bergamottöl in Dammar. (Ausführliche Kritik dieser Methoden s. bei Schaffer, l. c.)

Lepkowski (Anat. Hefte 1. Abth. 8. Bd. 1897 p. 568) injicirt zum Studium der Gefässe in den Zähnen zunächst lösliches Berlinerblau (in Wasser und Glycerin gelöst), härtet dann den Zahn sammt seinem Stück Kiefer 1—2 Tage lang in $50\,^0/_0$igem Formol, entkalkt ihn in $10\,^0/_0$iger Salpetersäure (8—14 Tage lang, mehrere Male zu wechseln) und bettet ihn nach gutem Auswaschen zum Schneiden in Celloidin ein.

Ueber die Vergoldung der Zähne nach Underwood s. oben p. 219, nach Lepkowski s. Anat. Anzeiger 7. Jahrg. 1892 p. 274.

800. Färbung des Knorpels und entkalkten Knochens. Die gesammte Technik hierzu hat Schaffer (Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 1) ausführlich behandelt. Folgende Methoden scheinen sich am besten zu eignen.

Methode von Schaffer (l. c. p. 17), eine Modifikation der Methode von Bouma (Centralbl. Med. Wiss. 21. Jahrg. 1883 p. 866): die Schnitte von dem mit Salpetersäure (Chromsäure ist nicht so gut) entkalkten Knochen färbt man $^1/_2$—1 Stunde lang mit einer $^1/_{20}\,^0/_0$ igen wässerigen Lösung von Safranin, wäscht sie aus, legt sie auf 2—3 Stunden in eine $^1/_{10}\,^0/_0$ige Lösung von Sublimat und dann entweder in Glycerin oder (nach Abspülung mit Alkohol, Abtrocknung mit Filtrirpapier und langer Behandlung mit Bergamott- oder Nelkenöl) in Balsam. Knorpel orange, Knochen ungefärbt (oder nach Chromsäure grün), Mark roth.

Bayerl (Arch. Mikr. Anat. 23. Bd. 1884 p. 35) entkalkt verkalkten Knorpel wie oben § 557 angegeben, bringt ihn in Paraffin, färbt die Schnitte mit Borax- und Indigkarmin (oben § 340) und schliesst sie in Balsam ein. Flesch (Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 351) rühmt diese Methode besonders zum Studium der Zahnentwicklung.

Zschokke (ibid. 10. Bd. 1893 p. 381) empfiehlt Benzoazurin in wässeriger Lösung für ossifizirenden Knorpel. Ueber die Methode von Baumgarten s. oben § 342.

Mörner (Skand. Arch. Phys. 1. Bd. 1889 p. 216; Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1890 p. 508) giebt einige Färbungen, besonders zu mikrochemischen Reaktionen, für Trachealknorpel an. Eine Kritik dieser Methoden liefert Wolters (Arch. Mikr. Anat. 37. Bd. 1891 p. 492); im Uebrigen s. auch Terrazas in: Riv. Trimestr. Micr. Madrid Vol. 1 1896 p. 113.

801. Andere Methoden für Knochen oder Knorpel. Nach Ewald (Zeit. Biol. 34. Bd. 1897 p. 246) füllen sich in den Knochenstrahlen der Flossen kleinerer Fische sämmtliche Lakunen mit Luft, wenn man die Strahlen direkt in absoluten Alkohol bringt; die Luft entweicht auch nicht beim Ueberführen durch Nelkenöl in Balsam.

Spuler (Sitz. Ber. Physik. Med. Soc. Erlangen 27. Heft 1896 p. 93) konservirt die nur 3—4 mm dicken Scheiben von elastischem Knorpel in Pikrinosmiumplatinchlorid nach vom Rath (oben § 83) oder in „$^1/_2$ % iger Sublimatlösung unter Zusatz von 0,2 % Eisessig“, bringt sie ganz langsam durch Alkohol in Chloroform, eben so sorgfältig in Paraffin und färbt die aufgeklebten Schnitte entweder mit seinem Hämalaun (oben p. 149) oder mit Safranin oder Orceïn; mit letzteren beiden entweder nur 1 oder 4—10 Tage lang.

Fusari (Arch. Ital. Biol. Tome 25 1896 p. 200; Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 488) legt die Schnitte durch frischen Knorpel auf 24 Stunden in 1 % ige Lösung von Höllenstein, dann in Wasser, entwässert sie und setzt sie in Balsam dem Lichte aus. S. auch Schiefferdecker, Gewebelehre p. 331.

Blut.

802. Literatur. Die Technik zur Untersuchung des Blutes ist äusserst verwickelt; man sehe z. B. das umfangreiche Buch von Hayem (Du sang et de ses altérations anatomiques, Paris 1889 1035 pgg.; ausführliches Referat in: Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 330), ferner die zahlreichen Schriften von Löwit, Ehrlich u. s. w. u. s. w.

Die neueste Arbeit von Giglio-Tos (Mem. Accad. Torino (2) Tomo 47 1897 p. 37) bringt zwar keine eigenen Methoden, aber viel Literatur. Ueber Blut und Lymphorgane der Invertebraten s. Cuénot (Arch. Anat. Micr. Paris Tome 1 1897 p. 153). Hier seien aus Mangel an Raum nur einige allgemeiner brauchbare Methoden angegeben.

803. Ueber Normalsalzlösungen zur Untersuchung frischen Blutes s. oben § 385.

804. Fixiren und Konserviren. Die ehrwürdige Methode des Eintrocknens eines Bluttropfens über der Flamme deformirt die Blutkörperchen so sehr, dass man sie möglichst wenig anwenden sollte. Besser mischt man das Blut sofort mit einem Fixir- und Konservirmittel und studirt es auch darin.

Die meisten neueren Autoren betrachten die **Osmiumsäure** als bei weitem das getreueste Fixirmittel. Man mischt 1 oder 2 Tropfen (nach Biondi genau 2) mit 5 ccm einer 1—2 %igen Osmiumsäure, lässt es darin 1—24 Stunden und kann es dann in Lösung von Kaliumacetat aufbewahren (Flesch in: Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 83). Die genaue Stärke der Osmiumsäure muss man übrigens je nach der Art des Blutes ausprobiren; Biondi empfiehlt die 2 %ige. Griesbach (ibid. 7. Bd. 1890 p. 328) kombinirt damit zugleich die Färbung (mit Methylgrün oder Methylviolett, Kristallviolett, Safranin, Eosin, Säurefuchsin, Rhodamin oder Jodjodkalium). Rossi (ibid. 6. Bd. 1890 p. 475) nimmt gleiche Theile von 1 %iger Osmiumsäure, Wasser und einer starken Lösung von Methylgrün; für Dauerpräparate giebt er langsam Glycerin hinzu. S. übrigens auch § 805.

Arnold (Arch. Path. Anat. 148. Bd. 1897 p. 479) lässt das Blut von *Rana* direkt in 1 %ige Osmiumsäure hineintropfen, ersetzt nach 24 Stunden die Säure durch immer stärkeren Alkohol, durch Aether-Alkohol, zuletzt durch Celloidin und giesst das Ganze in dünner Schicht auf eine Glasplatte. Die so erhaltenen feinen Membranen löst man mit Wasser vom Glase ab und färbt sie nach Belieben. — Ewald (Zeit. Biol. 34. Bd. 1897 p. 257) nimmt auf je 3—4 Tropfen Blut von Amphibien und Reptilien 10 ccm einer Lösung von 1/2 % Osmiumsäure und 1/2 % Kochsalz (für Säugethiere etwas mehr Salz: 0,6 bis 0,7 %), hebert nach 24 Stunden mit dem „Capillarheber" (oben p. 4) die Flüssigkeit ab und ersetzt sie durch Wasser, Alaunkarmin etc., schliesslich durch 50 %igen Alkohol.

Die **Sublimat-Gemische** von Pacini (oben § 401) hielt man früher für gut. Hayem (l. c.; Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 335) verwendet Sublimat 1, Kochsalz 2, Natriumsulfat 10 und Wasser 400. Hiervon setzt er zum Blut im Verhältniss von 100:1; auch Eosin kann man hinzufügen. Nach Mosso (Atti Accad. Lincei Rend. Vol. 4 Sem. 1 1888 p 431) ist aber die Menge des Sublimats zu gering. Löwit (Sitz. Ber. Akad. Wien 95. Bd. 3. Abth. 1887 p. 129; Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 75) nimmt konzentrirte Sublimatlösung 5 ccm, Natriumsulfat 5 g, Kochsalz 2 g und Wasser 300 ccm.

Natürlich kann man auch andere gute Fixirmittel, z. B. Flemmings oder Hermanns Gemisch, für das Blut verwenden.

Gulland (Brit. Med. Journ. No. 1889 1897 p. 652; Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 62) bestreicht Deckgläser mit einer dünnen Schicht Blut, bringt sie auf 3—4 Minuten in ein Gemisch von 25 ccm Aether, 25 ccm gesättigter Lösung von Eosin in absolutem Alkohol und 5 Tropfen einer Lösung von 1 g Sublimat in 5 ccm absolutem Alkohol, wäscht sie mit Wasser, färbt sie 1 Minute lang in konzentrirter wässeriger Lösung von Methylenblau, wäscht sie wieder, entwässert sie und bringt sie durch Xylol in Xylolbalsam.

Lavdowsky beschreibt in einer ausführlichen Studie (Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 4) seine Fixirung mit 2%iger Jodsäure und seine Färbung mit Neu-Viktoriagrün, Methylviolett 6 B oder Gentianaviolett; er hat damit auch da Kerne gefunden, wo man sie sonst allgemein vermisst.

805. Färben (s. auch § 804). Konservirtes Blut kann man mit vielen von den gebräuchlichen Mitteln färben. Eosin färbt in den Blutkörperchen alle Theile, die Hämoglobin enthalten, rosenroth; Wissozky (Arch. Mikr. Anat. 12. Bd. 1876 p. 479) nimmt dazu eine Lösung von „gleichen Theilen Eosin und Alaun in 200 Theilen Alkohol" und färbt die Kerne mit „konzentrirter Hämatoxylinlösung" nach. Moore (Microscope 1882 p. 73; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1882 p. 714) färbt 3 Minuten lang mit einer ähnlichen Lösung (aber ohne Alaun), wäscht aus und dann 2 Minuten lang mit einer 1%igen wässerigen Lösung von Methylgrün. Ueber Chenzinskis Gemisch s. oben § 316, Merkels Gemisch § 340.

Frisches Blut behandelt man vielleicht am besten nach Bizzozero & Torre (Arch. Sc. Med. Torino Vol. 4 1880 p. 390) wie folgt: man verdünnt einen Tropfen Blut mit Normalsalzwasser (0.75%), worin eine Spur Methylviolett gelöst ist; dieses Gemisch kann auch zur Untersuchung von Knochenmark und Milz dienen.

Mehrere Methoden zum Färben der Erythrocyten in den mit Alkohol gehärteten Geweben (es handelt sich um Blutungen in der Haut) giebt Unna (Monatsh. Prakt. Derm. 21. Bd. 1895 p. 1; Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 234) an.

Toison (Journ. Sc. Méd. Lille 1885; Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 398) setzt zum Blut ein Gemisch von 1 g Methylviolett 5 B, 4 g Kochsalz, 32 g Natriumsulfat, 120 ccm Glycerin (von 30° Baumé) und 640 ccm Wasser (das Methylviolett wird im Glycerin und der Hälfte vom Wasser gelöst, die Salze im Reste des Wassers). Die Leucocyten färben sich in 20—30 Minuten ganz intensiv violett, die Erythrocyten grünlich. — S. auch oben § 307.

Ferriers Gemisch soll dasselbe spez. Gewicht haben wie die Blutflüssigkeit: Fuchsin 1 g, Wasser 150 ccm, Alkohol 50 ccm, Glycerin 200 g (nach Squire, Methods p. 39).

Leclerq nimmt Fuchsin und nachher Malachitgrün, oder Congoroth und nachher Gentianaviolett und Eosin (Bull. Soc. Belg. Micr. 16. Année 1890 p. 61; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1890 p. 675). Dekhuyzen (Verh. Anat. Ges. 6. Vers. 1892 p. 90) verwendet Methylenblau und Fuchsin, Giglio-Tos (Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 359) Methylenblau BX.

Natürlich sind die Gemische von Ehrlich-Biondi (oben § 306) und Ehrlich (oben § 307, 322) für manche hämatologische Untersuchungen höchst werthvoll. Löwit (Beitr. Path. Anat. 10. Bd. 1891 p. 214; Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 371) färbt das in Sublimat konservirte Blut 1—2 Minuten lang mit dem konzentrirten Gemisch von Ehrlich-Biondi und untersucht es in Wasser oder Glycerin. Knoll (Sitz. Ber. Akad. Wien 102. Bd. 3. Abth. 1894 p. 441; 105. Bd. 3. Abth. 1896 p. 35) fixirt das Blut einige Minuten lang mit 2 %iger Osmiumsäure, lässt es auf einem Deckglase langsam trocknen, färbt es nach Ehrlich-Biondi und untersucht es in halbkonzentrirtem Glycerin. (Die Methode gilt auch für das Blut von Wirbellosen.)

Weiteres über die Körnchen in den Leucocyten etc. s. in der eben citirten Arbeit von Löwit, ferner in Ehrlich, Methodol. Beitr. Phys. Leucocyten (Zeit. Klin. Med. 1. Bd. 1880 p. 558; Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 382), bei Löwit (Anat. Anzeiger 6. Jahrg. 1891 p. 344; Arch. Mikr. Anat. 38. Bd. 1891 p. 524), bei Gulland (Journ. Phys. Cambridge Vol. 19 1896 p. 385); s. auch Hirschfeld (Arch. Path. Anat. 149. Bd. 1897 p. 22). Einzelheiten über Ehrlichs Methode der Deckglas-Präparate bei Reinbach (Arch. Klin. Chir. 46. Bd. 1893 p. 486; Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 258). Die Methode von Foà s. oben § 351. — Müller (Sitz. Ber. Akad. Wien 98. Bd. 3. Abth. 1890 p. 219; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1893 p. 365) giebt u. A. als neue Methode die Vergoldung von Blut auf dem Deckglase nach Ranvier. S. auch Saxer in: Anat. Hefte 1. Abth. 6. Bd. 1896 p. 347 und Pappenheim (Arch. Path. Anat. 151. Bd. 1898 p. 89).

806. Färben des Fibrins. Weigert (Fortschr. Med. 5. Bd. 1887 p. 228; Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 512) färbt die Schnitte von Material aus Alkohol mit einer konzentrirten Lösung von Gentiana- oder Methylviolett in Anilinwasser (oben p. 169), trocknet sie auf einem Objektträger mit Filtrirpapier ab und giesst Lugols Gemisch (§ 76) darauf. Nach genügender Einwirkung trocknet er sie wieder ab und giebt einen Tropfen Anilin darauf, der, sobald er sich dunkel färbt, 1 oder 2 mal erneuert wird. Sind die Schnitte so zugleich differenzirt und entwässert, so wird das Anilin sorgfältig durch Xylol verdrängt und zuletzt Balsam und ein Deckglas darauf gelegt. — S. die Modifikationen dieser Methode von Kromeyer (oben § 643) und Benecke (§ 781).

Unna (Monatsh. Prakt. Derm. 20. Bd. 1895 p. 140; Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 229) empfiehlt ausser einer Modifikation der obigen Methode eine andere mit polychromem Methylenblau und Jodjodkalium, sowie eine mit Fuchsin und Tannin.

807. Blutplättchen. Kemp (Stud. Biol. Lab. J. Hopkins Univ. Vol. 3 1886 p. 293) weist sie einfach dadurch nach, dass er einen grossen

Tropfen Blut auf einen Objektträger bringt und rasch etwas Normalsalzwasser (0.75 %) darüber fliessen lässt. Die Blutplättchen bleiben am Glase kleben. Will man sie fixirt untersuchen, so bringt man auf den Finger, bevor man ihn ansticht, einen Tropfen Lösung von Osmiumsäure. Zur Färbung nimmt Bizzozero (Arch. Path. Anat. 90. Bd. 1882 p. 278; Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 389) eine $^1/_{50}$ %ige Lösung von Methylviolett oder eine $^1/_{30}$ %ige von Gentianaviolett in Normalsalzwasser.

Bizzozeros Methoden zum Zählen der Plättchen und zum Studium ihrer Regeneration s. in: Internation. Beitr. Wiss. Med. 1. Bd. 1891 p. 459; Arch. Ital. Biol. Tome 16 1892 p. 375; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 229. — Die Anwendung der künstlichen Verdauung auf Blut s. bei Lilienfeld (Arch. Anat. Phys. Phys. Abth. f. 1892 p. 115; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1893 p. 363); Methoden zur Gewinnung grosser Mengen Blutplättchen bei Druebin (Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 493). S. auch Brodie & Russel (Journ. Phys. Cambridge Vol. 21 1897 p. 390; Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 392).

808. Schnitte durch Blut. Biondi (Arch. Mikr. Anat. 31. Bd. 1888 p. 103) veröffentlicht eine komplizirte Methode zum Schneiden der Blutkörperchen. Er bettet das Blut in Agar-Agar ein; Schiefferdecker (Gewebelehre p. 389) empfiehlt dazu Celloidin. S. auch oben p. 376 (Arnold).

Drüsen.

809. Schleimdrüsen. Hoyer (Arch. Mikr. Anat. 36. Bd. 1890 p. 310) berichtet in einer ausführlichen Arbeit, die auch die ältere Literatur über die Schleimdrüsen und Becherzellen namentlich der Wirbelthiere umfasst, über seine zahlreichen Versuche zur Färbung des thierischen Schleimes („Mucins“). Er verwendet von den Theerfarbstoffen hauptsächlich Thionin, das in der Regel die Gewebe blau, den Schleim roth tingirt, macht aber eine Anzahl anderer Farbstoffe namhaft, die ebenfalls metachromatisch färben, z. B. Toluidinblau. Methylenblau färbt den Schleim sehr stark und eignet sich daher gut zu seiner Entdeckung, wenn er nur in Spuren zugegen ist.

Die Objekte fixirt Hoyer meist 2—8 Stunden lang mit 5 %iger Lösung von Sublimat, bringt sie später in Paraffin und färbt die Schnitte 5—15 Minuten lang in einer sehr schwachen Lösung des Farbstoffs (2 Tropfen der konzentrirten Lösung auf 5 ccm Wasser).

Hyalinknorpel, Whartonsche Sulze und die Ehrlichschen Mastzellen färben sich mit den basischen Theerfarbstoffen genau so wie Schleim.

S. ferner über Schleimfärbung Sussdorf (D. Zeit. Thiermed. 14. Bd. p. 345; Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 205), Bizzozero (Arch. Mikr. Anat. 33. Bd. 1889 p. 240; 40. Bd. 1892 p. 331; etc.; Atti Accad. Torino Vol. 24 1889 p. 130; Vol. 27 1892 p. 19 etc.; Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 61; 9. Bd. 1892 p. 219) und Unna (Monatsh. Prakt. Derm. 20. Bd. 1895 p. 365; Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 42). Bizzozero verwendet Safranin von Bindschedler & Busch in Basel, Unna hauptsächlich sein polychromes Methylenblau (oben § 286), zu dessen Differenzirung und Fixirung in den Schnitten er genaue Vorschriften giebt. — S. auch oben p. 173.

Die neueste spezielle Schrift über das Färben thierischen Schleimes ist von Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p. 303; Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 38). Dieser bespricht nicht nur die gebräuchlichen Theerfarbstoffe: Methylgrün, Jodgrün, Methylenblau, Methylviolett, Thionin, Toluidinblau, Bismarckbraun und Safranin, sowie die Hämateïnthonerde-Gemische, sondern giebt auch die Formel zur Bereitung von 2 Gemischen, die ausschliesslich den Schleim färben (Mucikarmin und Muchämateïn, § 810 u. 811). Ein Gemisch von relativ viel Methylviolett und wenig Methylenblau in wässeriger Lösung mit etwas Essigsäure färbt die Kerne blau, den Schleim roth (p. 314); auch Unnas polychromes Methylenblau (oben § 286) tingirt sehr gut. Die rothe Färbung des Schleimes mit Thionin ist wenig haltbar, etwas besser die mit Toluidinblau (p. 315). Sehr scharf färbt sich der Schleim, allerdings schmutzig violett, aber auch in Balsam haltbar, wenn man eine konzentr. Lösung von Safranin in 30 $^0/_0$ igem Alkohol, mit Salzsäure schwach angesäuert, auf die Schnitte über Nacht einwirken lässt und mit Alkohol abspült (p. 317). Mit Lösungen von Hämateïnthonerde färbt sich, wenn sie freie Säure oder relativ viel Alaun enthalten (z. B. Mayers Hämalaun), der Schleim meist nicht, wohl aber, wenn sie mit relativ viel Hämateïn und wenig Alaun bereitet sind, oder wenn man sie mit Wasser verdünnt oder die Säure des Alauns vorsichtig (mit Brunnenwasser oder Kaliumacetat) abstumpft (p. 305). Jedenfalls verhalten sich die Schleime je nach ihrer Provenienz verschieden gegen die Färbmittel, wie es ja auch mehr als nur eine Art Mucin giebt; andererseits werden vom Thionin, das Hoyer (s. oben § 809) als Spezifikum für die Mucinfärbung anführt, vom Safranin etc. auch Substanzen gefärbt, die bestimmt kein Mucin enthalten, z. B. die Corpora amylacea der Pathologen, Eiweiss, Gummi

arabicum etc. (p. 321 ff.). Die Metachromasie bei Safranin (gelb), Thionin (roth), Methylviolett etc. ist wohl rein optischer Natur, beruht hingegen beim Jodgrün, Methylgrün, dem polychromen Methylenblau und Safranin (violett) auf Verunreinigungen mit anderen Farbstoffen (p. 328).

Kultschitzky (Arch. Mikr. Anat. 49. Bd. 1897 p. 8) fixirt die Gewebe in seinem Gemisch (oben p. 36) und färbt die Paraffinschnitte entweder mit Safranin (gelöst in 2 %iger Essigsäure) oder in Neutralroth (2—3 Tage lang, dann mit Alkohol auswaschen).

810. Mucikarmin nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p. 317). Karmin 1 g, Chloraluminium 0,5 g und destill. Wasser 2 ccm werden über einer kleinen Flamme etwa 2 Minuten lang erhitzt, bis das Gemisch ganz dunkel geworden ist. Dazu setzt man nach und nach 100 ccm Alkohol von 50 % und filtrirt 24 Stunden später. Diese Stammlösung gebraucht man nur ausnahmsweise entweder direkt oder nach Verdünnung auf $^1/_5$—$^1/_{10}$ mit Alkohol von 50 oder 70 %, in der Regel aber mit (destillirtem oder) gewöhnlichem Wasser auf $^1/_{10}$ zu Mucikarmin (Gehalt an Karmin $^1/_{1000}$) verdünnt, das in den Schnitten oder dünnen Membranen nur den Schleim färben darf, nicht auch die Kerne, die man übrigens vorher mit Hämalaun färben mag. Die Färbung ist in Balsam oder Vosselers Terpentin unbegrenzt lange haltbar.

811. Muchämateïn nach Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p. 307). Man verreibt 0,2 g Hämateïn mit einigen Tropfen Glycerin und giebt dazu Chloraluminium 0,1 g, Glycerin 40 ccm und destill. Wasser 60 ccm. Filtriren kaum nöthig. — Alkoholische Lösung p. 308): Hämateïn 0,2 g, Chloraluminium 0,1 g, Alkohol (von 70 %) 100 ccm, Salpetersäure 1—2 Tropfen. Beide Lösungen dienen zur Färbung des Schleimes in Schnitten oder dünnen Membranen; namentlich die wässerige färbt ihn gewöhnlich ungemein rasch, ohne sich um die übrigen Bestandtheile der Zellen zu kümmern. Die Kerne mag man vorher mit Parakarmin färben.[1])

[1]) Wenn der Schleim stark zum Quellen neigt, wie z. B. in der Haut von Fischen, so empfiehlt sich seine Färbung mit dem alkoholischen Mucikarmin oder Muchämateïn, da sonst namentlich auf den Schnitten die Bilder leicht unklar werden. Man muss dann auch beim Fixiren wässerige Gemische möglichst vermeiden. [M.]

812. Färbung des Schleims mit Eisen. Mayer (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p. 326) lässt Schnitte, mit einer schwachen Lösung von Eisenacetat in dünner Schicht bedeckt, einige Tage lang in einer feuchten Kammer liegen; der Schleim hat dann meist so viel Eisen aufgenommen, dass er gelb geworden ist, jedenfalls aber mit Gerbsäure schwarz oder mit Ferrocyankalium und Salzsäure blau wird. — List (ibid. p. 490) erhält eine scharfe Färbung des Schleimes, indem er die Schnitte mit einer Lösung von Eisenchlorid, die mit Salzsäure angesäuert ist, $^1/_2$ Stunde lang behandelt und dann mit Ferrocyankalium bläut. (S. auch § 638.)

813. Die Vertheilung der Schleimdrüsen in der Haut von Nacktschnecken und Anneliden macht Racovitza (Arch. Z. Expér. (3) Tome 2 1894 Notes p. 8; Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1895 p. 224) dadurch kenntlich, dass er die Thiere mit Essigsäure tödtet, dann in toto mit Methylgrün, das im Gemisch von Ripart & Petit (§ 404) aufgelöst ist, färbt und nach 3—6 Tagen, wenn nur noch die Drüsen tingirt sind, in Glycerin und Riparts Gemisch zu gleichen Theilen untersucht.

814. Becherzellen. Der Schleim in ihnen färbt sich, wie oben § 809 angegeben ist. S. auch Paneth (Arch. Mikr. Anat. 31. Bd. 1888 p. 113), und List (ibid. 27. Bd. 1886 p. 481), wo die ältere Literatur verzeichnet ist.

Ranvier (Compt. Rend. Tome 78 1887 p. 145; Zeit. Wiss. Mikr. 5. Bd. 1888 p. 233) behandelt die Mucosa im Pharynx von *Rana* erst 10—12 Stunden lang mit Dämpfen von Osmiumsäure, dann 3 Minuten lang mit solchen von Ueberrutheniumsäure (RuO_4) und erhält so das Mucigen in den Becherzellen ganz schwarz.

815. Speicheldrüsen. Solger (Festschrift Gegenbaur Leipzig 2. Bd. 1896 p. 211) härtet die Submaxillaris des Menschen entweder direkt in Alkohol von 96 % oder 3—9 Tage lang in „Formalin (10 procentig)“ oder in Sublimat nach M. Heidenhain etc. Färbung in toto oder der Paraffinschnitte wie gewöhnlich, besonders mit Ehrlichs oder Delafields Hämatoxylingemisch. Auch untersucht er die nach eigener Methode (oben § 180) angefertigten Gefrierschnitte. In Formalin halten sich die Sekretkörner von *Homo* sehr gut (auch nach dem Einlegen der Schnitte in Glycerin), nicht aber die von *Lepus* (p. 229). — R. Krause (Arch. Mikr. Anat. 45. Bd. 1895 p. 94) färbt die Schnitte entweder mit Eisenhämatoxylin nach Heidenhain oder mit dem Gemisch von Biondi oder mit Thionin (dieses ist kein spezifisches Reagens auf Schleim). S. auch Krause (ibid. 49. Bd. 1897 p. 709).

816. Magendrüsen. Kolster (Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1895 p. 314) differenzirt in den Magendrüsen die zwei Zellarten dadurch, dass er die Schnitte zuerst mit „Hämatoxylin" überfärbt, dann mit saurem Alkohol (1 % Salzsäure) auszieht, mit alkalischem Alkohol (1 % Ammoniak) wieder bläut — sie dürfen dann nur noch blass blau sein — auswäscht und 1—5 Minuten lang mit schwacher Lösung von Säurefuchsin nachfärbt: Hauptzellen hellblau, Deckzellen roth. Die Methode ist nicht anwendbar auf Material aus Osmiumsäure. — S. auch Oppel, Lehrb. Vergl. Mikr. Anat. Wirbelthiere 1. Der Magen Jena 1896.

817. Leber. Braus (Denkschr. Med. Nat. Ges. Jena 5. Bd. 1896 p. 307) behandelt die Gallencapillaren nach der schnellen Methode von Golgi, wobei er zum Fixiren der Leber ein Gemisch von 1 Theil Formol und 3 Theilen Müllerschem Gemisch oder $^1/_8$ % iger Chromsäure verwendet. Er schneidet die Stücke hinterher meist aus freier Hand, konstatirt aber, durch Behandlung der Schnitte nach Kallius (§ 757) und Färbung mit Hämateïnthonerde, dass die Capillaren weiter verlaufen, als das Silberchromat sie anzeigt, und hält daher die Resultate der Golgischen Methode, soweit sie negativ sind, für nicht beweiskräftig. Zum Fixiren der Leber dient sonst ein Gemisch von 1 Theil Formol und 3 Theilen wässeriger 7 $^1/_2$ % iger Sublimatlösung, worin die Gewebe fast gar nicht schrumpfen. Färbung meist mit Bordeaux R und Eisenhämatoxylin oder mit Biondis Gemisch.

Holm (Z. Jahrb. Abth. Morph. 10. Bd. 1897 p. 283) fixirt die äusserst fettreiche Leber von *Acanthias* mit einem Gemisch von 5 Theilen Alkohol und 1 Theil Chloroform, bettet sie in Paraffin ein und färbt die Schnitte.

Oppel (Anat. Anzeiger 5. Jahrg. 1890 p. 144; 6. Jahrg. 1891 p. 168) bringt Stücke der in Alkohol konservirten Leber oder Milz auf 24 Stunden in eine Lösung von Kaliummonochromat ($^1/_2$—10 %), spült sie mit einer sehr schwachen Lösung von Höllenstein ab, legt sie auf 24 Stunden in eine $^3/_4$ % ige Lösung von Höllenstein, wäscht sie aus, entwässert sie und schneidet sie aus freier Hand oder in Paraffin. Die Gitterfasern sind nur nahe der Oberfläche gefärbt, man muss also parallel zu ihr schneiden.

S. auch Ranviers Vorlesungen über die „Membranes muqueuses et le système glandulaire" (Journ. Microgr. Paris Tome 9 u. 10 1885 bis 1886); ferner R. Krause (Arch. Mikr. Anat. 42. Bd. 1893 p. 57), Miura (Arch. Path. Anat. 97. Bd. 1884 p. 144; Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 243: Vergoldung der Fasernetze) und Kupffer (Sitz.

Ber. Ges. Morph. Phys. München 5. Bd. 1889 p. 82; Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1890 p. 506: Färbung der Gallencapillaren mit Hämatoxylinkupfer nach Heilmayer und Anwendung der Golgischen Methode nach Böhm, oben § 749, für dieselben und die Netze).

818. Milz. Ueber die Gitterfasern s. oben § 817. Kultschitzky (Arch. Mikr. Anat. 46. Bd. 1895 p. 675) studirt die Muskulatur an Schnitten (von Material aus Müllers Gemisch), die 1 bis mehrere Tage lang in einer Lösung von Lakmoid in Aether gefärbt und in Balsam eingeschlossen werden; ferner die elastischen Fasern (p. 676) an Schnitten, die $^1/_2$—24 Stunden lang in einem Gemisch von 96 %igem Alkohol (800 Theile), 1 %iger Lösung von Kaliumkarbonat (40 Theile), in Wasser löslichem Magdalaroth (2 Theile) und Methylenblau (1 Theil) gefärbt sind, endlich die Blutgefässe (p. 681) an Schnitten (von Material aus Müllers Gemisch), die mit einer Lösung von Säurerubin (1—2 Theile) in 3 %iger Essigsäure (400 Theile) mehrere Minuten gefärbt, in 2 %iger Essigsäure ausgewaschen und in Helianthin etc. oder Chinablau (Wasserblau), die in analoger Weise gelöst sind, so lange nachgefärbt werden, bis das Rubin nur noch in den Erythrocyten bleibt. — S. auch Whiting (Trans. R. Soc. Edinburgh Vol. 38 1896 p. 311).

819. Niere. Sauer (Arch. Mikr. Anat. 46. Bd. 1895 p. 110) diskutirt sehr ausführlich die Methoden zur Untersuchung des Epithels und erklärt zuletzt von Fixirmitteln für das beste das Gemisch von Carnoy (Alkohol absol. 60, Chloroform 30, Eisessig 10 Theile; 3—5 Stunden lang, dann direkt absoluter Alkohol); danach kommen ihm Alkohol (90 ccm von absolutem oder 90 %igem) mit Salpetersäure (10 ccm) und Perényis Gemisch. Der Ersatz des absoluten Alkohols durch Xylol muss sehr langsam geschehen, ebenso der Uebergang in Paraffin von 56 ° Schmelzpunkt. Die aufgeklebten Schnitte färbt man mit Eisenhämatoxylin und bringt sie zuletzt in 90 %igen Alkohol mit etwas Säurerubin, das den Härchensaum färbt. Zum Maceriren dienen Jodserum oder Drittelalkohol (nachher Färbung mit Dahlia).

32. Kapitel.

Einige Methoden zur Untersuchung niederer Thiere.

820. Allgemeines. In diesem Kapitel sollen nur solche Abänderungen der gewöhnlichen Methoden angegeben werden, die zum Studium besonders schwieriger Organismen nöthig sind; dabei aber wird es sich fast ausschliesslich um Methoden für histologische Zwecke handeln, nicht aber um solche zur Präparation von Thieren für Museen oder für die gröbere Anatomie. Freilich werden manchmal auch die histologischen Methoden mit sehr gutem Erfolge für die anderen Zwecke dienen können.

Einige Worte über Formaldehyd mögen hier ihren Platz finden. Es hat die Konservirung für Museen ausserordentlich erleichtert, und man darf wohl als sicher annehmen, dass es zum Aufbewahren mancher zarter Organismen dem Alkohol weit überlegen ist. Denn da es absolut nicht entwässert, so fällt auch jegliche Schrumpfung weg. Dagegen giebt es als Fixirmittel selbst für Museen wohl nur sehr selten gute Resultate, und so sollten in den allermeisten Fällen die Thiere zuerst kunstgerecht mit einem der erprobten und geeigneten Mittel fixirt, eventuell nachher auch ausgewaschen und dann erst in der Lösung von Formaldehyd aufgehoben werden.

Brauchbare Angaben über viele Methoden zur Konservirung von Seethieren macht Lo Bianco (Mitth. Z. Stat. Neapel 9. Bd. 1890 p. 435; Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 54). Alle Citate von Lo Bianco weiter unten beziehen sich auf diese Schrift. S. auch oben § 70 die Angaben von Fol über die Konservirung mit Eisenchlorid.

Tunikaten.

821. Fixiren. Lo Biancos Methode zum Tödten einfacher Ascidien s. oben § 22. Dies gilt übrigens nur von *Ciona*, *Ascidia* und *Rhopalaea*; andere hingegen (*Clavellina*, *Perophora* etc.) muss

man erst 3—12 Stunden lang durch Chloralhydrat (1:1000 Seewasser) betäuben, dann in einem Gemisch von 1 Theil 1 %iger Chromsäure und 10 Theilen Essigsäure tödten und in 1 %iger Chromsäure härten.

Die zusammengesetzten Ascidien mit kontraktilen Einzelthieren sind nicht leicht zu behandeln. Am besten geht es noch nach einer Methode von van Beneden, die mir Dr. C. Maurice mitgetheilt hat, indem man sie sich zuerst gut ausstrecken lässt, dann sie mit den Fingern ergreift, rasch in Eisessig steckt, darin 2—6 Minuten (je nach der Grösse; man nehme übrigens recht kleine) lässt, wieder mit den Fingern (jedenfalls nicht mit einem eisernen Geräth, das Flecken geben würde) herausholt und in 50 %igen Alkohol bringt; hierin wäscht man sie gut aus und führt sie allmählich in stärkeren Alkohol über. Ich empfehle diese Methode ganz besonders, da sie sehr gut konservirte Präparate ohne Spuren von Trübungen giebt. — Lo Bianco narkotisirt sie mit Choralhydrat (wie oben) und fixirt sie mit Sublimat oder Chromessigsäure.

Caullery (Bull. Sc. France Belg. Tome 27 1895 p. 4) betäubt die zusammengesetzten Ascidien mit Cocaïn nach Lahille (einige Tropfen einer 5 %igen Lösung auf 30 ccm Seewasser) rasch und fixirt sie dann hauptsächlich mit Flemming's Gemisch oder nach van Beneden mit Eisessig.

Die meisten kleinen pelagischen Tunikaten fixirt man sehr leicht mit Osmiumsäure oder angesäuertem Sublimat. Lo Bianco nimmt für *Pyrosoma* Alkohol von 50 % mit 5 % Salzsäure, bringt sie aber nach $^1/_4$ Stunde durch Alkohol von 60 % in immer stärkeren. Die harten Salpen tödtet er mit 10 %iger Essigsäure, die halb weichen in 1 %iger Chromsäure mit 5 % Essigsäure, die weichen in 1 %iger Chromsäure mit $^1/_{50}$ % Osmiumsäure; die Doliolíden mit Sublimat, der eben erwähnten Osmiumsäure oder seinem Gemisch von Kupfersulfat und Sublimat (oben § 56).

Bryozoen und Brachiopoden.

822. Bryozoen. Einige Methoden s. oben § 11, 18 und 19. Lo Bianco empfiehlt für *Pedicellina* und *Loxosoma* Betäuben mit Chloralhydrat und Fixiren mit Sublimat. *Flustra, Bugula* etc. tödtet er nach Eisig (oben § 16). *Cristatella* s. oben § 17. S. auch unten § 863.

Conser (Trans. Amer. Micr. Soc. Vol. 17 1896 p. 310) tödtet Süsswasserbryozoen mit Cocaïn, bringt sie dann auf 1 Stunde in 1 %ige Chromsäure, von da in Wasser und allmählich in Alkohol von 80 %.

823. Brachiopoden. Lo Bianco tödtet die kleinen Thiere direkt in Alkohol von 70 %, grössere erst nach Betäubung mit Alkohol und Seewasser.

Blochmann (Untersuch. fein. Bau Brachiopoden Jena 1892 p. 5) fixirt am liebsten mit Sublimat und macerirt nach Hertwig (oben § 530), entkalkt mit 1 %iger Chromsäure (bei dickeren Schalen mit Zusatz von etwas Salz- oder Salpetersäure) oder mit Salpetersäure in Alkohol von 50—70 %, färbt hauptsächlich mit Delafields Hämatoxylingemisch (auch Eosin oder Orange G) oder mit Boraxkarmin und Indigkarmin und bettet in Paraffin oder Celloidin ein; in letzterem keine Schrumpfungen. Injektionen mit Berlinerblau oder mit 2 %iger blauer oder rother Gelatine. — Ekman (Zeit. Wiss. Z. 62. Bd. 1896 p. 172) hat den Stiel der Brachiopoden meist mit Flemmings Gemisch fixirt; er schneidet ihn aus freier Hand in Leber, nur selten in Paraffin. Färbung fast stets mit Böhmers Hämatoxylingemisch und Eosin.

Mollusken.

824. Fixiren. Zwei Ordnungen der Mollusken bereiten grosse Schwierigkeiten: die Lamellibranchier und die Gastropoden.

Um die Lamellibranchier ausgestreckt zu konserviren, narkotisirt sie Lo Bianco 6—12 Stunden (oder auch länger je nach der Spezies) mit Alkohol (oben § 16) und tödtet sie erst dann. Carazzi (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p. 388) hält bei *Ostrea* die Narkose für äusserst wichtig, um Kontraktionen beim Konserviren möglichst zu vermeiden, oder auch beim Studium der frischen Gewebe, namentlich der Kiemen; er bedient sich ebenfalls des Zusatzes von Alkohol, empfiehlt aber, das Gefäss mit dem Thier warm zu halten (25° C.), und erzielt so in 24 Stunden völlige Narkose. Dann schneidet er zur Untersuchung der Kiemen alle 4 Lamellen aus, fixirt sie in einem Sublimatgemisch ähnlich dem von Gilson (oben § 62) 1—2 Stunden lang (den ganzen Körper der Auster, nachdem sie angeschnitten worden, 4—6 Stunden lang), bringt sie direkt in Jodalkohol, dann in absoluten Alkohol, schneidet die beiden äusseren Lamellen ab und bettet nur die beiden inneren, die also von allen bisherigen Operationen möglichst wenig gelitten haben, ein.

Gastropoden. Lo Bianco narkotisirt mit Alkohol die Prosobranchier und von den Heteropoden die Atlantiden. Ueber die Erstickung von Landschnecken s. oben § 23, das Narkotisiren mit Hydroxylamin § 20.

Die Opisthobranchier empfehle ich, rasch mit Perényischem Gemisch oder Eisessig (§ 821) abzutödten. *Aplysia* narkotisirt man nach Robert (Bull. Sc. France Belge Tome 22 1890 p. 449; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 216) durch subcutane Injektion von 1 ccm einer 5—10 %igen Lösung von Cocaïnchlorhydrat; nach Schönlein (Zeit. Biol. 30. Bd. 1893 p. 187) mit 1 ccm einer 4 %igen Lösung von Pelletierin. Lo Bianco giebt für die Opisthobranchier je nach Genus oder Spezies ganz verschiedene Mittel zum Betäuben und Fixiren an (s. Original p. 467). Von den Pteropoden fixirt er die Cymbuliiden mit Perenyis Gemisch 1/4 Stunde lang (dann in Alkohol von 50 %), *Hyalaea* mit Sublimat. *Creseis* hingegen betäubt er erst mit Alkohol und die Gymnosomen mit Chloralhydrat (1/10 %).

Nach Heymans (Bull. Acad. Belg. (3) Tome 32 1896 p. 578) lassen sich die Cephalopoden durch Injektion von etwas Bromäthyl unter die Haut völlig lähmen, während die Athmung ruhig weiter geht (also ähnlich wie die Säugethiere durch Einathmen von Chloroform oder Aether).

Heteropoden und Pteropoden halten sich nach guter Fixirung mit Sublimat oder einem Chromgemisch wenigstens äusserlich ganz vorzüglich in Formaldehyd, besser als in Alkohol.

825. Centralnervensystem der Pulmonaten. Nabias (Act. Soc. Linn. Bordeaux 1894: Rech. hist. et organ. centres nerveux Gastéropodes p. 2) fixirt die Ganglien der Pulmonaten im geöffneten Thiere 1 Stunde lang in saurem Alkohol (6 Theile Eisessig auf 100 Theile Alkohol von 90 oder 100 %); oder 15—20 Minuten lang im Sublimatgemisch von Viallanes (§ 705), worauf er sie durch Wasser und schwachen Alkohol in 90 %igen überführt. Färbung der ganzen Ganglien nach allen möglichen Methoden, vorzugsweise mit dem Hämatoxylin-Eosin von Renaut (§ 347), dem Hämatoxylin und Kaliumbichromat von R. Heidenhain (§ 260) und mit Hämatoxylinkupfer nach Viallanes (§ 705). Einbettung durch Chloroform (1 Stunde) in Paraffin von 56° Schmelzpunkt (1/2—1 Stunde). Auch Färbung nach der raschen Methode von Golgi mit der Modifikation, dass die Ganglien gleich nach der Behandlung mit Osmiumsäure und Bichromat in Celloidin eingebettet, und erst die Schnitte mit Höllenstein behandelt werden (ibid. p. 34). Färbung mit Methylenblau durch Legen der Ganglien in situ in eine 1 %ige Lösung 12—24 Stunden lang.

826. Augen von Gastropoden. Flemming (Arch. Mikr. Anat. 6. Bd. 1870 p. 441), wirft den Fühler sammt dem Auge, das sich beim Abschneiden des Fühlers einstülpt, direkt in ganz schwache Chromsäure oder eine 4 %ige Lösung von Kaliumbichromat; darin stülpt es sich wieder aus und wird dann in letzterer Lösung oder mit Osmiumsäure oder Alkohol gehärtet.

Carrière (Z. Anzeiger 9. Jahrg. 1886 p. 221) fixirt das Auge nebst dem Stücke des Tentakels durch Dämpfe von Osmiumsäure und entpigmentirt (bei *Helix*) die Schnitte, die auf dem Objektträger mit Kollodium aufgeklebt sind, durch sehr verdünnte Eau de Javelle.

827. Augen von Cephalopoden und Heteropoden. Grenacher (Abh. Nat. Ges. Halle 16. Bd. 1886 p. 213; Zeit. Wiss. Mikr. 2. Bd. 1885 p. 244) fixirt die Augen der Cephalopoden entweder in Pikrinschwefelsäure oder in einer gesättigten Auflösung von Sublimat in Pikrinschwefelsäure (besonders gut für *Octopus*, *Eledone* und *Sepia*) und entpigmentirt sie mit Salzsäure (besser als mit Salpetersäure) oder dem oben § 574 angegebenen Gemisch; und zwar entweder sofort oder erst nach dem Färben mit Boraxkarmin, wo dann das Entpigmentiren und das Ausziehen des Karmins eine einzige Operation bilden. Man nimmt hierzu am besten 2—5 mm dicke Stücke der Retina. Einlegen der Schnitte in Ricinusöl (§ 445).

Aehnliche Methoden wendet Grenacher (ibid. 17. Bd. 1892 p. 3; Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 243) für die Augen der Heteropoden an.

Lenhossék (Zeit. Wiss. Z. 58. Bd. 1894 p. 636; Arch. Mikr. Anat. 47. Bd. 1896 p. 45) untersucht die Augen der Cephalopoden nach der Golgischen Methode. Ebenso Kopsch (Anat. Anzeiger 11. Bd. 1895 p. 362), der aber dabei statt der Osmiumsäure Formol nimmt.

828. Ueber die **Augen der Lamellibranchier** s. Patten (Mitth. Z. Stat. Neapel 6. Bd. 1886 p. 733) und Rawitz (Jena. Zeit. Naturw. 22. Bd. 1888 p. 115 und 24. Bd. 1890 p. 579: Pikrinsalpetersäure; zum Bleichen alkoholische Natronlauge, oben § 572).

829. Schalen. Schliffe durch die Schalen erhält man leicht auf die gewöhnliche Art durch Schleifen oder wohl besser nach den Methoden von Koch oder Ehrenbaum (oben § 175 u. § 178). Moseley (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 25 1885 p. 40) empfiehlt zum Entkalken eine 3—4 %ige Salpetersäure.

830. Injektionen. Flemming (Arch. Mikr. Anat. 15. Bd. 1878 p. 252) bringt die zu injicirende Muschel durch Schnee und Salz zum Gefrieren und legt sie dann auf 1/2 Stunde in lauwarmes Wasser; das Thier ist nun todt und zum Injiciren gut. Chloroform oder Aether taugen dazu nicht (s. aber oben § 20). Die Canüle bindet er ins Herz ein und umgiebt die Schnittfläche der Schliessmuskeln und des Herzbeutels mit frisch angerührtem Gips. Ist dieser erstarrt, so kann man das Thier injiciren. — S. auch Dewitz, Anleit. zur Anfert. zootom. Präp. Berlin 1886 p. 44 *(Anodonta)* und p. 52 *(Helix)*.

831. Methoden zum Maceriren des Epithels (s. auch § 903). Engelmann (Arch. Phys. Pflüger 23. Bd. 1880 p. 505) macerirt den Darm von *Cyclas*, nachdem er das Thier kurze Zeit auf 45—50° C. erwärmt hat, in 1/5 %iger Lösung von Osmiumsäure oder in konzentr. Lösung von Borsäure. Ferner lassen sich die Fortsätze der Cilien in den Zellen isoliren, wenn man frisches Darmepithel von *Anodonta* in 4 %iger Lösung von Kaliumbichromat oder 10 %iger von Kochsalz zerzupft; will man sie aber in situ erhalten, so macerirt man die Zellen höchstens 1 Stunde lang in konzentr. Lösung von Bor- oder Salicylsäure (auch 1/10 %ige Osmiumsäure ist gut). Die Seitenzellen der Kiemen behandelt man am besten mit Borsäure (5 Theile konzentr. Lösung und 1 Theil Wasser).

Das Gemisch von Haller s. § 531, das von Brock § 527, die von Möbius § 528 (das zweite rühmt Drost sehr für *Cardium* und *Mya*, s. Morph. Jahrb. 12. Bd. 1886 p. 163). Patten (Mitth. Z. Stat. Neapel 6. Bd. 1886 p. 736) empfiehlt sowohl zum Maceriren als auch zum Aufbewahren verdünnte Schwefelsäure (40 Tropfen auf 50 ccm Wasser); ganze Muscheln ohne Schale halten sich darin Monate lang.

832. Ueber die **Hautdrüsen der Aeolidier** s. oben § 813, über den **Mantelrand der Prosobranchier** unten § 903.

Arthropoden.

833. Allgemeine Methoden. Zum Studium von Thieren mit chitinöser Haut sind die Methoden und Winke von Mayer (s. oben p. § 7, 9, 78, 240, 241) in vieler Beziehung recht brauchbar. Jedenfalls ist es absolut nöthig, zum Fixiren, Auswaschen und Färben, wenn man die Thiere nicht öffnen kann, nur Flüssigkeiten zu verwenden, die leicht eindringen. Daher nehme man, wo es geht, Pikrinsäure-Gemische und zum Auswaschen und Färben alkoholische Mittel, also z. B. die starke

Pikrinschwefelsäure oder die Pikrinsalpetersäure, dann 70 %igen Alkohol hinterher. Jedoch ist auch Sublimat für viele Arthropoden ein vorzügliches Mittel, so z. B. für Copepoden und die Larven von Decapoden (Giesbrecht nimmt neuerdings für marine Copepoden eine konzentrirte Lösung von Pikrinsäure in Seewasser); mitunter verwendet man ihn vortheilhaft in alkoholischer Lösung. Manchmal ist auch Osmiumsäure gut (z. B. für *Copilia, Sapphirina* und die Phyllosomen); alsdann mag die Methode mit der Pyrogallussäure (oben § 377) recht nützlich sein.

Kann man vor dem Fixiren die Thiere öffnen oder zerschneiden, so verfährt man nach den gewöhnlichen Methoden.

Ostracoden fixirt Müller (Fauna Flora Golf. Neapel 21. Monogr. 1894 p. 8) mit einem Gemisch von 5 Theilen Aether und 1 Theil absoluten Alkohol und bringt sie dann in 70 %igen Alkohol.

Die schwer durchlässigen Pauropoden fixirt Kenyon (Tufts Coll. Stud. No. 4 1896 p. 80) in Carnoys Gemisch (Alkohol, Chloroform und Essigsäure, s. § 72), schneidet sie zum Färben etc. entzwei und bettet sie schliesslich in Celloidin und nachher in Paraffin ein. — Nach Michael (Trans. Linn. Soc. London (2) Vol. 7 1897 p. 478) lässt sich die Acaride *Bdella* besser mit Pikrinschwefelsäure als mit Flemmings Gemisch fixiren, da dieses nur sehr schlecht eindringt.

834. Aufhellen und Erweichen von Chitin. Ueber die Anwendung von Eau de Javelle s. § 549 u. 894. List (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 212) behandelt mit gutem Erfolg die gehärteten Cocciden 18—24 Stunden lang mit Eau de Javelle, das auf das 5fache verdünnt ist: das Chitin wird weich und erlaubt gute Schnitte. Vor dem Einbetten in Paraffin färbt er die Thiere 5—6 Tage lang mit Alaunkarmin oder Pikrokarmin. Ueber das Entpigmentiren der Antennen von Myriopoden s. Sazepin (Mém. Acad. Pétersbourg Tome 32 1884 p. 11): Chloroform mit etwas rauchender Salpetersäure. S. auch die Methode von Mayer (§ 568) und von Viallanes (§ 705). Ueber die Prüfung auf Chitin s. Zander (Arch. Phys. Pflüger 66. Bd. 1897 p. 545).

835. Gehirn von Apis. Kenyon (Journ. Comp. Neur. Cincinnati Vol. 6 1896 p. 133) behandelt es nach Golgi (nur 15—20 % geben gute Resultate) oder härtet es in einem Gemisch von 1 Theil Formol und 2 Theilen einer 5 %igen Lösung von Kupfersulfat und färbt es dann mit Hämatoxylin nach Mallory (oben § 266).

836. Bauchstrang. Binet (Journ. Anat. Phys. Paris 30. Année 1894 p. 469) fixirt den Bauchstrang der Hexapoden theils nach Flemming

oder Hermann, theils mit Sublimat nach Viallanes (§ 705) und behandelt zum Studium der Zellen und Fasern (auch von Crustaceen) die ganzen Ganglien mit Hämatoxylinkupfer nach Viallanes (§ 705), färbt auch die Paraffinschnitte mit Safranin nach, das zuerst nur von den Bindegewebszellen aufgenommen wird. Die Methoden von Golgi und Ehrlich bieten vergleichsweise geringen Nutzen.

837. Augen. S. die älteren Methoden von Lankester & Bourne (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 23 1883 p. 180; *Limulus)*, von Hickson (ibid. Vol. 25 1885 p. 243; *Musca*) und von Parker (Bull. Mus. Harvard Coll. Vol. 20 1890 p. 1; Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 82: *Homarus).* Ferner oben § 575 und 294 die von Parker *(Scorpio* und Dekapoden, besonders *Astacus).*

Ueber das Präpariren der Augen der Phalangiden s. Purcell (Zeit. Wiss. Z. 58. Bd. 1894 p. 1). Er bringt sie auf 20 Minuten in ein Gemisch einer gesättigten wässerigen Lösung von Pikrinsäure und absol. Alkohol zu gleichen Theilen, das entweder kalt (für Retina und Rhabdome) oder auf 45° C. erwärmt (für Nervenfasern) angewandt wird.

Rosenstadt (Arch. Mikr. Anat. 47. Bd. 1896 p. 748) fixirt die Augen von Decapoden in einem warmen Gemisch von 3 Theilen konzentr. Sublimatlösung und 1 Theil Perényischem Gemische und entpigmentirt sie in verdünntem, auf 56° C. erwärmtem Königswasser (Salzsäure und Salpetersäure je 3, Wasser 100) in wenigen Stunden.

Die Methode von Viallanes für Decapoden s. oben § 705.

838. Injektion von kleinen Arthropoden, speziell Arachniden und Crustaceen. Aimé Schneider (Tablettes Zool. Poitiers Tome 2 1892 p. 123) empfiehlt dazu lithographische Tusche. Er betäubt die Thiere mit Chloroform, injicirt sie sofort und legt sie in starken Alkohol.

Causard (Bull. Sc. France Belg. Tome 29 1896 p. 16) injicirt die Spinnen mit Tusche, bringt sie dann sofort in starken Alkohol und secirt sie später unter Wasser, eventuell mit einer Spur Ammoniak, wie Vogt & Yung (Lehrb. Prakt. Vergl. Anat. 2. Bd. 1889 p. 199) angegeben haben.

839. Färben des Chitins. Bethe (Z. Jahrb. Abth. Morph. 8. Bd. 1895 p. 544; Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1896 p. 498) erzeugt im Chitin Anilinschwarz. Die Objektträger mit den aufgeklebten Schnitten bringt er auf 3—4 Minuten in eine frische 10 %ige Lösung von Anilin-

chlorhydrat, der auf je 10 ccm 1 Tropfen Salzsäure zugesetzt worden ist. Dann spült er sie mit Wasser ab, legt sie, mit den Schnitten nach unten, in eine 10 %ige Lösung von Kaliumbichromat und wiederholt beide Operationen so oft, bis die Färbung intensiv genug wird. Dabei müssen aber, um Niederschläge zu vermeiden, die Objektträger immer wieder gut mit Wasser abgespült werden. Das Chitin ist zuerst grün, wird aber in Leitungswasser oder Alkohol mit etwas Ammoniak blau. — Speziell für die Otolithen von *Mysis* gilt folgendes Verfahren: man bringt sie auf 8—14 Tage in Alkohol von 40 % und fügt allmählich Salpetersäure hinzu, sodass schliesslich der Alkohol 20 % Säure enthält; das Chitin erweicht, und auch die Otolithen lockern sich, sodass man mitunter gute Schnitte durch sie erhält.

Würmer.

840. Enteropneusten. Lo Bianco (l. c. p. 460) fixirt sie mit Pikrinschwefelsäure oder $^1/_2$ %iger Chromsäure und betäubt sie auch wohl vorher mit Alkohol.

841. Myzostoma. Wheeler (Mitth. Z. Stat. Neapel 12. Bd. 1896 p. 227) fixirt sie mit Sublimat, Sublimat und Essigsäure, oder Pikrinsäure und Essigsäure; die Schnitte färbt er mit Eisenhämatoxylin (nach Heidenhain) und hinterher mit Orange G in konzentr. wässeriger Lösung.

842. Chätopoden. *Lumbricus* betäubt man, indem man ihn in Wasser mit etwas Chloroform bringt. Perrier (Arch. Z. Expér. Tome 3 1874 p. 373) stellt das Chloroform aber lieber in einem Schälchen neben das Gefäss mit dem Wasser, deckt über beide eine Glocke und findet später die Würmer völlig ausgestreckt todt vor. Cerfontaine (Arch. Biol. Tome 10 1890 p. 327; Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 210) injicirt den Thieren etwa 2 ccm einer $^1/_5$ %igen Lösung von Curare und legt sie in Wasser, wo sie bereits in einer $^1/_4$ Stunde sterben.

Um *Criodrilus* zu tödten, bringt Collin (Zeit. Wiss. Z. 46. Bd. 1888 p. 474) ihn mit wenig Wasser in ein Glas und hängt darin einen Streifen Fliesspapier, der mit Chloroform getränkt ist, auf. Kükenthal (Mikrosk. Technik 1885; Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 61) narkotisirt die Anneliden entweder durch Alkohol in 4—8 Stunden oder durch $^1/_{10}$ %iges Chloralhydrat (in Seewasser). Auch Lo Bianco

(l. c. p. 463) verwendet dazu Alkohol (5 % absoluten) 2—12 Stunden lang und fixirt sie dann in Alkohol von 70 und 90 %; die allermeisten marinen Anneliden (s. im Original) lassen sich so behandeln, aber z. B. *Siphonostomum* erfordert erst eine 5 %ige Lösung von Chloralhydrat und dann eine 1 %ige Chromsäure; auch einige Röhrenwürmer betäubt er erst mit Chloralhydrat ($^1/_{10}$ %), damit sie aus ihren Gehäusen herauskommen. Die Alciopiden fixirt er in seinem Gemisch von Sublimat und Kupfersulfat (oben § 56), wäscht sie gut mit Wasser aus und bringt sie in Alkohol; ebenso die Tomopteriden, für die sich aber auch einfache Sublimatlösung eignet. Jaquet (Bibliogr. Anat. Paris 3. Année 1895 p. 32) tödtet *Lumbricus* gut ausgestreckt in einer reichlichen Menge verdünnter Salpetersäure (1:125 Wasser).

Ich finde, dass die 1 %ige Chromsäure, wie sie Lo Bianco anwendet, zwar für Schaustücke gut ist, histologisch aber weniger befriedigen wird als Sublimat. Letzteren darf man übrigens bei den Röhrenwürmern mit ihren zarten Kiemen nie warm verwenden, da diese häufig durch die Hitze schrumpfen; ähnlich empfindlich sind auch *Eunice* und *Onuphis*. Im Uebrigen vergl. die Methoden § 18 bis 24; über das Gemisch von Ehlers s. § 43. S. auch § 51.

Rievel (Zeit. Wiss. Z. 62. Bd. 1896 p. 292) fixirt *Ophryotrocha* ausgestreckt in heissem Gemisch von Lang (oben § 60) 5—8 Minuten lang, *Lumbricus* in heissem Sublimat-Alkohol oder heisser Pikrinschwefelsäure 10—15 Minuten lang.

Eisig (Fauna Flora Golf. Neapel 16. Monogr. 1887 p. 295) fixirt die betäubten (§ 16) Capitelliden, nachdem er sie mit Cactusstacheln festgesteckt und geöffnet hat, mit konzentr. Sublimatlösung, wäscht sie nach ganz kurzer Zeit erst mit Seewasser ($^1/_2$ Stunde lang) aus, spült sie mit Süsswasser ab, färbt sie direkt mit Boraxkarmin, zieht aus etc. und führt sie zuletzt durch Terpentinöl (4 Theile) und Kreosot (1 Theil) in Balsam über oder bettet sie in Paraffin ein. Ueber die Maceration s. § 524. Um ganze Organe herauszupräpariren, legt er vorher die Thiere auf mehrere Stunden in 1 %ige Essigsäure.

Zum Färben von kleinen Anneliden in toto hat mir Karmalaun sehr gute Dienste geleistet und scheint mir darin dem Borax- oder Parakarmin überlegen zu sein.

Blutgefässe. Kükenthal (Mikrosk. Technik Jena 1885; Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 61) öffnet die Thiere und legt sie auf

2—3 Stunden in Königswasser (2 Theile Salpetersäure und 1 Theil Salzsäure): die Gefässe treten auf gelbem Grunde schwarz hervor.

Für die Nerven sind zu verwenden Methylenblau und Höllenstein (rasche Methode von Golgi; s. Lenhossék in: Arch. Mikr. Anat. 39. Bd. 1892 p. 102). S. auch Lewis (Anat. Anzeiger 12. Bd. 1896 p. 292) und die Methoden von Apáthy (oben § 703 und § 704).

Zur Topographie der Hautdrüsen s. die Methode von Racovitza (§ 813), über die Muskeln § 670.

Reinigen des Darms von *Lumbricus*. Kükenthal (Biol. Centralbl. 8. Bd. 1888 p. 80) bringt die Thiere in ein hohes Glas voll feuchten Fliesspapiers; sie entleeren dann allmählich ihren erdigen Koth und füllen statt dessen ihren Darm mit Papier. Vogt & Yung (Lehrb. Prakt. Vergl. Anat. 1. Bd. 1888 p. 448) empfehlen dafür Kaffeesatz zu nehmen, da dieser später in Paraffin nicht hart wird wie Papier, das sich schlecht schneidet. Joest (Arch. Entwickelungsmech. 5. Bd. 1897 p. 425) hält die Würmer einige Tage lang in feuchter Leinewand und findet dann ihren Darm ganz leer. Zum Narkotisiren dient am besten Chloroformwasser (s. § 15).

843. Hirudineen. Zum Tödten dienen dieselben Methoden wie für *Lumbricus* (§ 842), ferner auch die im § 18—24. Whitman (Methods p. 27) tödtet sie mit Sublimat, der ungemein rasch wirkt. Ich habe bessere Resultate durch Narkotisiren mit Kohlensäure (oben § 24) und Fixiren mit Flemmingschem Gemisch erhalten (kleine *Nephelis* sind schon nach einigen Minuten betäubt, grössere erst nach Stunden). Auch Citronensaft tödtet sie schön ausgestreckt. Zum Färben in toto finde ich Karmalaun ausgezeichnet; für Schnitte eignet sich mitunter das Gemisch von Ehrlich-Biondi sehr gut. Graf (Jena. Zeit. Naturw. 28. Bd. 1893 p. 165, s. auch oben § 53) narkotisirt sie mit Absud von Tabak. Ueber das Macerirgemisch von Apáthy s. § 534.

Injektionen. Whitman (Amer. Natural. Vol. 20 1886 p. 313) hat oft sehr gute Selbstinjektionen von Thieren erhalten, die mit schwacher Chromsäure oder ähnlichen Mitteln konservirt waren, und hält solche Injektionen zum Studium der Gefässe auf Schnitten für die besten. Jacquet (Mitth. Z. Stat. Neapel 6. Bd. 1885 p. 298) legt die Thiere erst auf 1—2 Tage in Wasser mit etwas Chloroform und injicirt sie dann.

844. Gephyreen. Nach Vogt & Yung (Lehrb. Prakt. Vergl. Anat. 1. Bd. 1888 p. 376) muss man *Sipunculus nudus* einige Tage in ganz

reinem Seewasser halten, damit der Darmkanal frei von Sand wird, der ja beim Schneiden hinderlich sein würde, und dann mit Chloroform narkotisiren, um sie ausgestreckt fixiren zu können. Ward (Bull. Mus. Harvard Coll. Vol. 21 1891 p. 144) betäubt die Thiere langsam (in 4—8 Stunden) mit Alkohol und bringt sie dann in 50 %igen Alkohol. Lo Bianco (l. c. p. 462) fixirt sie entweder mit 1/2 %iger Chromsäure oder narkotisirt sie mit 1/10 %iger Lösung von Chloralhydrat in Seewasser; *Phascolosoma* und *Phoronis* schläfert er mit Alkohol ein.

Nach Apel (Zeit. Wiss. Z. 42. Bd. 1885 p. 461) lassen sich *Priapulus* und *Halicryptus* nur durch Hitze gut tödten: entweder erwärmt man das Wasser mit ihnen auf 40° C. oder man wirft sie in kochendes Wasser, holt sie rasch heraus, schneidet sie auf und härtet sie in 1/2 %iger Chromsäure oder in Pikrinschwefelsäure.

845. Rotatorien. Um die lebendigen Thiere unter dem Mikroskope in Ruhe beobachten zu können, empfiehlt Weber (Arch. Biol. Tome 8 1888 p. 713) eine 2 %ige Lösung von Cocaïnchlorhydrat; auch warmes Wasser leistet bei den grösseren Arten, wie *Brachionus* und *Hydatina*, gute Dienste. Hardy (Journ. R. Micr. Soc. London f. 1889 p. 475) setzt dem Wasser tropfenweise dicken Zuckersyrup zu, Hudson (ibid. p. 476) nimmt statt dessen eine schwache Lösung von Salicylsäure. Ueber Hydroxylamin s. oben § 20, Chlormagnesium § 21, Wasserstoffhyperoxyd § 25. Auch mag man nach Braun (unten § 863), Eismond und Jensen (unten § 875) verfahren oder Methylenblau (oben § 288) verwenden.

Dauerpräparate gewinnt man nach Rousselet (Journ. Quekett Micr. Club (2) Vol. 6 1895 p. 6), indem man zunächst dem Wasser in einem Uhrglase allmählich einige Tropfen eines Gemisches von 3 Theilen Cocaïnchlorhydrat (in 2 %iger Lösung), 1 Theil Alkohol von 90 % und 6 Theilen Wasser zusetzt, dann, wenn die Cilien nicht mehr schlagen, zum Fixiren 1 Tropfen Flemmingschen Gemisches oder von 1/4 %iger Osmiumsäure hinzugiebt, aber schon nach spätestens 1/2 Minute die Thiere mit einer Pipette heraushholt, zum Auswaschen durch 2 oder 3 Uhrgläser voll Wasser hindurchführt und definitiv in Wasser (16 Theile) mit Formol (1 Theil) aufhebt. Ich habe die Präparate selber gesehen und finde sie ausgezeichnet.

Conser (Trans. Amer. Micr. Soc. Vol. 17 1896 p. 310) behandelt die Rotatorien wie die Bryozoen (oben § 822), die Melicertiden aber

speziell mit viel Cocaïn, dann mit Formol (20 %) und zuletzt mit Chromsäure (1/2 %). — Zograf (Compt. Rend. Tome 124 1897 p. 245) narkotisirt sie mit Cocaïn, bringt sie dann auf 2—4 Minuten in Osmiumsäure (1/4—1/5 %), von da auf 5—10 Minuten in verdünnten rohen Holzessig (1 Theil mit 8—10 Theilen Wasser), alsdann in Wasser, Alkohol von 50—100 %, zuletzt in Glycerin oder Harz. (Dieselbe Methode, aber ohne Narkotisiren, ist auch gut für *Hydra* und Protozoen.)

846. Acanthocephalen. Sie gut ausgestreckt und zugleich histologisch brauchbar zu konserviren, ist nicht leicht. Gewöhnlich kommt man mit Sublimat oder starker Osmiumsäure nicht weit, sogar nach Narkotisirung mit Tabakrauch oder Chloroform. Hamann (Jena. Zeit. Naturw. 25. Bd. 1890 p. 113; Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 209) hat jedoch gute Erfolge mit Sublimat und auch mit Alkohol und ein wenig Platinchlorid gehabt. Säfftigen (Morph. Jahrb. 10. Bd. 1884 p. 120) tödtet die Thiere langsam in 1/10 %iger Osmiumsäure; zwar sind sie in den ersten Stunden stark kontrahirt, sterben aber schliesslich ganz ausgestreckt.

Aehnlich verhält es sich mit 1/10 %iger Chromsäure: sie leben zwei Tage lang darin, sterben aber völlig ausgestreckt.

Kaiser (Bibl. Z. Chun & Leuckart 7. Bd. 1891; Zeit. Wiss. Mikr. 8. Bd. 1891 p. 363) empfiehlt vor allem eine gesättigte wässrige Lösung von Cyanquecksilber, die, auf 45—50 ° C. erwärmt, 1/4—1 Stunde lang einwirkt und dann durch 70 %igen Alkohol ersetzt wird; ferner fixirt er die Thiere mit einem Gemisch von je 1 g Pikrinsäure und Chromsäure, 10 g Schwefelsäure und 1 Liter Wasser, ebenfalls warm (55 ° C.), 15—20 Minuten lang, wäscht sie 5—10 Minuten lang mit warmem Wasser aus und bringt sie auf einige Tage in Alkohol von 60 %.

847. Nematoden. Ihre äusserst undurchlässige Cuticula bereitet der guten Konservirung viele Schwierigkeiten. Diese lassen sich nach Looss (Z. Anzeiger 8. Jahrg. 1885 p. 318) durch Behandlung mit Eau de Javelle oder Labarraque (oben § 549) überwinden.

Zum Fixiren empfehlen die neueren Autoren meist Sublimatgemische; die Chromgemische scheinen die Gewebe brüchig zu machen. Zur Strassen (Zeit. Wiss. Z. 54. Bd. 1892 p. 655) fixirt jedoch *Bradynema rigidum* wenigstens 12 Stunden lang in Flemmingschem Gemisch. Nach Augstein (Arch. Naturg. 60. Jahrg. 1894 p. 255; Zeit. Wiss. Mikr.

12. Bd. p. 227) eignet sich für *Strongylus filaria* am besten Pikrinsalpetersäure.

Vejdovsky (Zeit. Wiss. Z. 57. Bd. 1894 p. 645) empfiehlt für *Gordius* als bestes Fixirmittel $^1/_2$ %ige Chromsäure (24 Stunden lang).

Lo Bianco (l. c. p. 462) konservirt die freien und parasitischen marinen Nematoden mit konzentrirter Sublimatlösung oder Pikrinschwefelsäure. Cobb verwendet seinen Differentiator (oben p. 3) zur Ueberführung der Nematoden aus dem Fixirgemisch in Balsam.

Das Färben ist oft schwer, und mitunter ergiebt nur alkoholisches Karmin (oben § 240) brauchbare Resultate.

Braun (Thierische Parasiten d. Menschen 1. Aufl.; Journ. R. Micr. Soc. London (2) Vol. 5 1885 p. 897) fixirt kleine Nematoden in verdünntem Müllerschen Gemisch, bringt sie dann in Alkohol von 25 % und 40 %, darauf in Glycerin und Wasser zu gleichen Theilen, endlich definitiv in Glyceringelatine (20 Theil Gelatine, 100 Theile Glycerin, 120 Theile Wasser und 2 Theile Karbolsäure). Kanadabalsam soll sie mitunter trübe machen.

Demonstration lebender Trichinen. Barnes (Amer. Month. Micr. Journ. Vol. 14 1893 p. 104; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1893 p. 406) verdaut ein Stück Trichinenfleisch mit Pepsin und Salzsäure 3 Stunden lang bei 37° C. und setzt so die Trichinen in Freiheit, um sie dann auf einem heizbaren Objekttisch zu untersuchen.

848. Nemertinen. Bei meinen mannigfachen Versuchen hat mir die kalte Sublimatlösung mit etwas Essigsäure noch die besten Dienste geleistet. Dagegen kann ich die Osmium- und Chromgemische nicht empfehlen, denn sie (besonders die letzteren und auch Eisenchlorid) bringen solche Kontraktionen der Muskeln zu wege, dass die Thiere ganz ihre Form verlieren; auch tödten sie nicht so rasch wie Sublimat. Grösseren Thieren schneide ich den Kopf ab, zerlege sie in nicht zu lange Stücke und werfe sie gleich in die Sublimatlösung, wo sie sich weniger stark kontrahiren, als wenn sie noch mit den Cerebralganglien in Zusammenhang sind. Besser als diese Methoden ist vielleicht die höchst einfache, die mir Du Plessis angerathen hat, nämlich das Fixiren mit nahezu kochendem Wasser. Die wenigen Thiere, die ich so konservirt habe, sind ausgestreckt gestorben, ohne ihren Rüssel auszustossen; daher ist dies besonders für die grösseren Spezies wohl den Versuch werth.

Lo Bianco (l. c. p. 461) betäubt die Nemertinen mit $^1/_{10}$ %iger Lösung von Chloralhydrat in Seewasser, worin sie 6—12 Stunden bleiben, und härtet sie dann in Alkohol von 70 %; besonders resistente Spezies kommen aus dem ersten Chloralhydrat noch auf einige Stunden in eine $^2/_{10}$ %ige Lösung.

Dendy (Proc. R. Soc. Victoria f. 1891 1892 p. 89; Journ. R. Micr. Soc. London f. 1893 p. 116) narkotisirt *Geonemertes* mit Dämpfen von Chloroform $^1/_2$ Stunde lang und konservirt sie dann in starkem Alkohol.

Zum Färben in toto empfehle ich nur alkoholische Mittel, besonders Boraxkarmin oder Mayers Karmin. Einbettung in Paraffin nach Durchtränkung mit Cedernöl (nicht mit Chloroform, das oft selbst nach Wochen noch nicht eingedrungen ist).

Bürger (Fauna Flora Golf. Neapel 22. Monogr. 1895 p. 443) wendet zum Studium des Nervensystems, der Nephridien, Haut, Muskulatur und des Darmes die Färbung mit Methylenblau intra vitam (oben § 291) an. Ferner macerirt er die Körperwand mit Drittelalkohol oder der Hertwigschen Osmiumessigsäure. Die grossen Spezies betäubt und fixirt er nach Lo Bianco, die kleinen legt er direkt in das Fixirgemisch (heisse konzentrirte Sublimatlösung oder Sublimateisessig) oder übergiesst sie damit, bringt sie aber bereits nach einigen Minuten in 70 %igen Alkohol, der überhaupt für die Nemertinen das beste Medium ist. Färben in toto mit Boraxkarmin, Hamannschem Karmin, Pikrokarmin, oder noch besser mit Mayerschem Karmin, ferner mit Hämalaun; Einbetten durch Xylol in Paraffin bei 50—54° C., aber höchstens 6 bis 8 Stunden lang, damit sie nicht zu hart werden. Aufkleben der Schnitte mit Eiweiss und Gelatine (oben § 194), Nachfärben mit Eosin, Ehrlichs Hämatoxylin, Methylgrün etc. etc.

Montgomery (Z. Jahrb. Abth. Morph. 10. Bd. 1897 p. 6) empfiehlt zum Fixiren vor Allem Sublimat (für die kleineren Spezies in konzentrirter wässeriger Lösung, 40° warm, für die grösseren in 50 %igem Alkohol gelöst), ferner Hermanns, Flemmings und Perényis Gemisch, räth dagegen ab von Chromsäure, Pikrinsäure, Pikrinschwefelsäure und absolutem Alkohol. Zum Studium der Zellstruktur reichen die Färbungen in toto nicht aus. Zur Ueberführung aus dem Alkohol in Paraffin und überhaupt als Vorharz eignet sich am besten Cedernöl. Speziell das Bindegewebe färbt sich gut mit Hämateïnthonerde, Biondis Gemisch, Borax- und Indigkarmin, Alaunkarmin oder mit Safranin, Gentianaviolett und Orange G.

849. Cestoden. Sie müssen natürlich hauptsächlich nach den gebräuchlichen Schnittmethoden studirt werden. Immerhin kann die Beobachtung am lebenden Thiere dienlich sein; nach Pintner (Vogt & Yung, Lehrb. Prakt. Vergl. Anat. 1. Bd. 1888 p. 202) bleiben Tänien einige Tage in gewöhnlichem Wasser mit ein wenig Eiweiss am Leben. Nach Lönnberg (Centralbl. Bakt. Parasitk. 11. Bd. 1892 p. 89) hat *Triaenophorus nodulosus* sogar 1 Monat lang in einer „schwach

sauren Pepsinpeptonlösung“ (3—4 % mit nicht ganz 1 % Chlornatrium) gelebt.

Zernecke (Z. Jahrb. Abth. Morph. 9. Bd. 1895 p. 92; Zeit. Wiss. Mikr. 12. Bd. 1896 p. 494) hat mit gutem Erfolge die Golgische Methode mit Höllenstein angewandt. Er tödtet *Ligula* mit dem Gemisch von Osmiumsäure und Kaliumbichromat (4:1), imprägnirt wie gewöhnlich, schneidet sie in Leber und behandelt sie mit Hydrochinon nach Kallius (§ 757). Auch Methylenblau leistete ihm gute Dienste.

Tower (Z. Anzeiger 19. Bd. 1896 p. 323) fixirt die Cestoden zum Studium des Nervensystems in vom Raths Platinpikrinosmiumsäure (§ 83) 10 Stunden lang, schneidet sie dann in Stücke von 1—3 cm Länge und legt diese auf 6—10 Stunden in rohen Holzessig und auf 24 Stunden in 70 %igen Alkohol. Einbettung in Paraffin.

Köhler (Zeit. Wiss. Z. 57. Bd. 1894 p. 386) wickelt die vorher mit Salzwasser (0.6 %) abgespülte Tänie über eine Glasplatte oder spannt sie mit Igelstacheln auf Kork fest und fixirt sie 2—3 Stunden lang mit 5 %iger Sublimatlösung. Dann 70 %iger Alkohol. Färbung der Schnitte 24 Stunden lang mit Orange G (auf 100 g der gesättigten Lösung 5 Tropfen Eisessig), dann nach dem Auswaschen in destill. Wasser mit Hämateïnthonerde. Oder die Thiere kommen (nach Maehrenthal, s. § 378) aus dem Alkohol auf 3 Stunden in Wasser, dann auf 1 Tag in $^1/_4$ %ige Osmiumsäure und nach 2stündigem Auswaschen auf 1 Tag in rohen Holzessig, von da wie gewöhnlich in Paraffin.

850. Trematoden. Fischer (Zeit. Wiss. Z. 40. Bd. 1884 p. 5) bettet *Opisthotrema cochleare* zum Schneiden in Seife ein (6 Theile in 7 Theilen 96 %igem Alkohol; die Masse schmilzt bei etwa 60°, dringt sehr rasch ein und erstarrt auch sehr rasch) und legt die Schnitte in Glycerin. Wright & Macallum (Journ. Morph. Boston Vol. 1 1887 p. 1) fixiren *Sphyranura* in Flemmings Gemisch und färben sie mit Alauncochenille. Für Cercarien ist nach Schwarze (Zeit. Wiss. Z. 43. Bd. 1886 p. 45) das einzige gute Fixirmittel kaltgesättigte Sublimatlösung auf 35—40° C. erwärmt. Lo Bianco (p. 460) fixirt die Trematoden mit heisser konzentr. Sublimatlösung.

Looss (Arch. Anat. Mikr. 46. Bd. 1895 p. 7) fixirt *Bilharzia* in warmer (50—60°) 1 %iger Lösung von Sublimat in 70 %igem Alkohol.

Bettendorf (Z. Jahrb. Abth. Morph. 10. Bd. 1897 p. 308) hat mit der schnellen Golgischen Methode nur bei *Distoma hepaticum* gute Resultate erhalten und zieht das Methylenblau (0,1 g, Salz 0,75 g, Wasser 100 ccm) vor.

851. Turbellarien. Braun (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 398) bringt, um Rhabdocölen ganz zu konserviren, die lebenden Thiere auf einen Objektträger, plattet sie mit dem Deckglase etwas ab und lässt dann unter das Deckglas ein Gemisch von 1 Theil 1 %iger Osmiumsäure und 3 Theilen Langschem Gemisch (oben § 60) fliessen. Er bettet sie später in Paraffin ein. Böhmig (ibid.) hat für Muskeln und Parenchym Salpetersäure und Pikrinschwefelsäure sehr gut gefunden.

Delage (Arch. Z. Expér. (2) Tome 4 1886 p. 114; Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 239) konservirt *Convoluta* mit seinem Gemisch von Karmin und Osmiumsäure (oben § 236) oder auch mit konzentrirter Lösung von Eisenoxydulsulfat. Er färbt sie entweder mit seinem Gemisch oder mit Goldchlorid, indem er Ameisensäure (1 Theil mit 2 Theilen Wasser) 2 Minuten lang, dann 1%iges Goldchlorid 10 Minuten, endlich 2%ige Ameisensäure 2—3 Tage lang im Dunkeln einwirken lässt, recht stark am Lichte reduzirt und mit einer 1%igen Lösung von Cyankalium die Färbung wieder blasser macht. Böhmig (Zeit. Wiss. Mikr. 3. Bd. 1886 p. 239) hat sehr gute Bilder von Plagiostomiden erhalten, die mit Sublimat fixirt und mit Osmium-Karmin gefärbt waren.

Nach Graff (Organisation d. Turbellaria acoela, Leipzig 1891; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1892 p. 76) ist die Konservirung mit Flemmings Gemisch und die Färbung mit Hämateïnthonerde gut für die Haut (allerdings nicht für die Rhabditen der Acölen und Allöocölen), desgleichen für das Parenchym von *Amphichoerus cinereus, Convoluta paradoxa* und *sordida.* Sublimat ist gut für *C. roscoffensis.* Bei einigen Spezies muss man Pikrokarmin vermeiden, da es das centrale Parenchym zerstört. Das Nervensystem behandle man nach Delage (s. oben).

Für die Dendrocölen scheinen zum Fixiren Sublimatlösungen, mitunter heiss, gut zu sein. Chichkoff (Arch. Biol. Tome 12 1892 p. 438) fixirt die Süsswasserformen ausgestreckt in einem Gemisch von 6 Theilen 2 %iger Lösung von Sublimat, 4 Theilen 15 %iger Essigsäure, 2 Theilen Salpetersäure, 8 Theilen 14 %iger Lösung von Chlornatrium und 1 Theil 2 %iger Lösung von Alaun. S. ferner die Gemische von Lang (oben § 60). Zum Färben der Drüsen eignet sich wohl Cochenilletinktur (§ 241) oder das Gemisch von Ehrlich-Biondi. Lo Bianco (l. c. p. 461) tödtet Rhabdo- und Dendrocölen mit heisser Sublimatlösung, schüttet sie sofort in viel kaltes Wasser und bringt sie dann in Alkohol. Einige Polycladen vertragen jedoch nur schwach erwärmte Sublimatlösung.

Voigt (Verh. Nat. Ver. Bonn 53. Jahrg. 1896 p. 118) konserv. *Planaria*, indem er das Wasser abschüttet, sie durch Uebergiessen mit einem Gemisch von 1 Theil konzentr. Salpetersäure und 3 Theilen Wasser tödtet und nach 1 Minute in 70—90 %igen Alkohol bringt. — Klinckowström (Arch. Mikr. Anat. 48. Bd. 1897 p. 589) fixirt *Prostheceraeus* nach Boveri in 70 %igem Alkohol mit 4 % Eisessig.

Jänichen (Zeit. Wiss. Z. 62. Bd. 1896 p. 256) empfiehlt für Planarien, besonders ihre Augen, Pikrinschwefelsäure (1—2 Stunden lang, dann Alkohol von 70 %). Osmiumsäure ist nicht gut und Müllers Gemisch macerirt geradezu. Die Schnitte durch die mit Boraxkarmin gefärbten und mit Salzsäure-Alkohol entfärbten Thiere kommen auf 10 Minuten in Osmiumsäure (Stärke nicht angegeben), dann auf 5—10 Minuten in Holzessig, beides „auf dem Wärmschrank". Maceration der Sehkolben in einem Gemisch von 100 ccm Wasser, 1 ccm Essigsäure und 1 g Kochsalz. Zum Bleichen des Augenpigmentes dient Wasserstoffhyperoxyd.

Echinodermen.

852. Allgemeines. Cuénot (Arch. Biol. Tome 11 1891 p. 316) fixirt die Echinodermen mit den gebräuchlichen Mitteln, hebt sie in 90 %igem Alkohol auf, entkalkt sie in 70 %igem, der mit etwas Salpeter- oder Salzsäure versetzt ist, bringt sie nach dem Entkalken zur völligen Entfernung der Kohlensäure auf wenigstens 12 Stunden in reinem Alkohol unter die Luftpumpe und färbt sie vor dem Schneiden doppelt: mit Pikro- oder Boraxkarmin und mit einer Lösung von Methylenblau in absol. Alkohol. Auch färbt er wohl die aufgeklebten Paraffinschnitte 12—18 Stunden lang mit einer Art Ehrlichschen Gemisches (konzentr. Lösung von Methylgrün 3 Theilen, von Orange III 2 Theilen und von Säurefuchsin 1 Theil), das zuvor mit dem 150fachen an Wasser verdünnt ist. S. auch oben § 551.

853. Holothurioideen. Sie sind schwer zu fixiren, da sie sich leicht so stark zusammenziehen, dass sie ihre Eingeweide ausspeien oder sich selber zerstückeln. Lo Bianco (l. c. p. 459) lässt *Holothuria* und *Stichopus* in reinem Seewasser ihre Tentakel ausstrecken, presst sie dann dicht dahinter mit den Fingern oder der Pincette so stark zusammen, dass sie diese nicht wieder zurückziehen können, und taucht sie mit dem Vorderkörper in konzentrirte Essigsäure; zugleich injicirt ein Assistent durch den Anus 90 %igen Alkohol, und sowie das Thier

todt ist, wird es in 70 %igem konservirt. Aehnlich werden die anderen Holothurien getödtet, indessen erfordert fast jedes Genus eine besondere Art der Behandlung. Die grossen *Synapta* kommen zuerst in ein Gemisch gleicher Theile von Seewasser und Aether (oder Chloroform), sterben darin ganz ausgestreckt und werden durch Wasser und schwachen Alkohol allmählich in starken gebracht.

Nach privater Mittheilung von Dr. Weber lassen sich die Holothurien vorzüglich in einer schwachen Lösung von Formaldehyd konserviren.

Gould (Bull. Mus. Harvard Coll. Vol. 29 1896 p. 125) lähmt *Caudina* mit Magnesiumsulfat nach Redenbaugh (oben § 21) und fixirt sie dann mit Perényis Gemisch, die Ovarien jedoch mit Sublimat. Die Zellgrenzen der Epithelien stellt er nach dem Abspülen der frischen Gewebe in destill. Wasser mit 1 %iger Höllensteinlösung dar. Die Nerven liessen sich nach Golgi oder mit Methylenblau nicht nachweisen.

Hérouard (Arch. Z. Expér. (2) Tome 7 1889 p. 537) tödtet *Cucumaria* durch Eintauchen in eine 40° warme 1 %ige wässerige Lösung von Chloralhydrat, während man ihr mit einer Pincette den Anus zuhält, sodass sie sich nicht kontrahiren kann.

Ueber das Färben der Muskeln mit Methylenblau s. Iwanzoff (Arch. Mikr. Anat. 49. Bd. 1897 p. 103).

854. Asteroideen. Hamann (Beitr. Hist. Echinodermen 2. Heft 1885 p. 2) injicirt das Fixirmittel vom Ende eines Armes aus in die Leibeshöhle und wirft das Thier, sobald die Füsschen und Kiemen geschwollen sind, in eine tüchtige Menge desselben Mittels. Speziell die Augen schneidet er ab, härtet sie in einem Gemisch gleicher Theile 1 %iger Osmiumsäure und 1 %iger Essigsäure, bettet sie in Gummiglycerin (oder eine andere Masse, die keine Vorbehandlung mit Alkohol nöthig macht) ein und erhält so Schnitte mit dem Pigment in situ; zum Maceriren dient Drittelalkohol.

Nach Weber ist Formaldehyd nicht brauchbar. Lo Bianco (l. c. p. 458) lässt die Thiere, auf den Rücken gelegt, in Alkohol von 20—30 % sterben, wenn er die Füsschen gut ausgestreckt haben will; *Luidia* wird in derselben Lage mit Chromessigsäure (10 Theilen Essigsäure, 1 Theil 1 %iger Chromsäure) übergossen und sofort in schwachen Alkohol gebracht. *Brisinga* ist direkt mit absolutem Alkohol zu tödten.

855. Ophiuroideen. Die kleinen kann man nach Lo Bianco (l. c. p. 458) direkt mit schwachem Alkohol fixiren, *Ophiopsila* mit abs. Alkohol, *Ophiomyxa* mit $^1/_2$ %iger Chromsäure. Die übrigen lässt man zuvor in Süsswasser absterben, damit sie die Arme nicht abwerfen.

Russo (Ricerche Lab. Anat. Roma Vol. 4 1895 p. 157) fixirt *Ophiothrix* in Osmiumsäure (etwa $^1/_2$ %ig) 1—2 Stunden lang und entkalkt sie dann durch 6—10tägiges Einlegen in Müllers Gemisch. Auch sehr gut ist ein Gemisch von 2 Theilen konzentr. Sublimatlösung, 1 Theil 70 %igem Alkohol und 1 Theil Essigsäure (spez. Gew. 1.06); die Thiere bleiben darin 3 Minuten und werden dann entweder in Müllers Gemisch oder in 70 %igem Alkohol mit 10 % Essigsäure entkalkt. Zur Färbung dient Parakarmin.

856. Echinoideen. Ich rathe an, das Fixirmittel zu injiciren. Nach Weber ist Formaldehyd in jeder Beziehung vorzüglich und dem Alkohol weit überlegen.

Lo Bianco (l. c. p. 458) tödtet sie wie die *Luidia* (s. oben p. 403) oder aber macht 2 Löcher in die Schale, lässt alles Wasser auslaufen und dafür Alkohol eintreten.

Ueber das Schleifen der Stacheln s. oben § 177.

857. Crinoideen. Lo Bianco (l. c. p. 458) konservirt *Antedon rosacea* direkt mit 70 %igem, *phalangium* mit 90 %igem Alkohol.

858. Larven. Nach Barrois (Lee & Henneguy, Traité 2. Ed. 1896 p. 457) handelt es sich bei der Anfertigung von Präparaten zum Studium der Metamorphose der Seeigel und Schlangensterne darum, das Kalkskelett intakt zu erhalten, ferner die übrigen Gewebe so zu härten, dass man die Larven unter dem Mikroskope unbeschädigt in jede beliebige Lage bringen kann, endlich aber die Region, wo das junge Thier sich anlegt, klar zu übersehen. Barrois empfiehlt nun nach vielen Proben folgende Methoden. Die Pluteus fixire man 2—3 Minuten lang mit konzentr. Sublimatlösung, wasche sie mit Wasser und bringe sie auf 12—24 Stunden in Cochenilletinktur (oben § 241), die aber mit Alkohol von 70 % so verdünnt sein muss, dass sie kaum noch gefärbt aussieht. Man achte auch darauf, die Larven im richtigen Moment herauszunehmen, und schliesse sie dann in Balsam oder oft besser noch in Nelkenöl oder Cedernöl ein. Bipinnarien und Auricularien behandle man ebenso, jedoch die ersten Stadien

der Metamorphose fixire man mit Osmiumsäure, färbe sie mit Beales Karmin und schliesse sie in Glycerin ein. Die Larven von *Comatula* fixire man mit Langs Gemisch (oben § 60) und färbe sie mit Boraxkarmin, aber mit verdünntem, da das konzentrirte überfärbt.

Das Betäuben vor dem Fixiren ist nützlich, besonders für die Pentacrinus-Stadien (Lo Bianco thut es mit Chloralhydrat $^1/_{10}$ %), die sich sonst ganz zusammenschliessen, und die jungen Synapten, die sonst durch Kontraktion verunstaltet werden.

Mac Bride (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 34 1892 p. 131) fixirt die Larven von ***Amphiura*** mit $^1/_2$%iger Osmiumsäure wenigstens 10 Minuten lang (mit 1%iger nur 5 Minuten), spült sie mit Wasser ab, bringt sie auf 18—20 Stunden in Müllers Gemisch, dann in Alkohol von 30—90% und entkalkt sie am folgenden Tage mit $^1/_2$—1%iger Salpetersäure in 90%igem Alkohol.

Seeliger (Z. Jahrb. Abth. Morph. 6. Bd. 1892 p. 168; Zeit. Wiss. Mikr. 10. Bd. 1893 p. 229) wirft Stücke der Pinnulae von ***Antedon*** in eine erkaltete heiss gesättigte Lösung von Sublimat in Seewasser (für die Furchung nach Zusatz von $^1/_{50}$—$^1/_{60}$ Vol. konzentr. Essigsäure) und bringt die Embryonen dann in Alkohol von 20—80%. Soll der Kalk erhalten bleiben, so fixirt er sie direkt in absolutem Alkohol.

Mac Bride (Q. Journ. Micr. Sc. (2) Vol. 38 1896 p. 340) fixirt die Larven von ***Asterina*** in Osmiumsäure, bringt sie auf 12—14 Stunden in Müllers Gemisch, bettet sie in Celloidin und nachher in Paraffin ein und färbt die Schnitte mit Karmalaun oder Delafields Hämatoxylin. Von beiden Farbstoffen nehmen sie mehr auf, wenn man sie vorher 24 Stunden lang in Boraxkarmin lässt. Die mit Wasser aufgeklebten Schnitte lösen sich nicht so leicht ab, wenn man sie aus dem Terpentinöl nicht direkt in Alkohol, sondern erst in Nelkenöl und dann in 90%igen Alkohol bringt.

Cölenteraten.

859. Nesselkapseln. Iwanzoff (Bull. Soc. Natural. Moscou (2) Tome 10 1896 p. 97) empfiehlt für die Nesselkapseln der Aktinien Maceration nach Hertwig in einem Gemisch von gleichen Theilen 0.04%iger Osmiumsäure (in Seewasser) und 0.2%igem Eisessig (in Seewasser), noch mehr Fixation mit Dämpfen von Osmiumsäure 2—5 Minuten lang, dann kurzes Auswaschen in Seewasser oder destill. Wasser; weniger gut ist der Ranviersche Drittelalkohol. Für die Nesselkapseln der Medusen zum Tödten nach Hertwig ein Gemisch gleicher Theile von 0.5%iger Osmiumsäure und 0.2%igem Eisessig, beides in destill. Wasser; die weitere Maceration in 0.1%iger Essigsäure. Oder auch eine Lösung von Methylgrün und Gentianaviolett mit etwas Osmiumsäure, um gleichzeitig zu fixiren und zu färben.

860. Aktinien. Ueber das Betäuben s. oben § 13 ff.

Fixiren. Andres (Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. 1880 p. 131) hat oft mit Sublimat gute Resultate erzielt. Grösseren Thieren injicirt

er die Lösung durch den Mund und übergiesst sie auch damit. Zuweilen ist Kälte anzurathen: man setzt das Glas mit den Aktinien in Schnee und Salz und lässt später den Eisblock in Alkohol oder einem anderen Fixirmittel zergehen. Lo Bianco (l. c. p. 448) fixirt je nach der Spezies entweder mit kochender Sublimatlösung (darauf einige Minuten in $^1/_2$ $^0/_0$ ige Chromsäure, dann Alkohol) oder mit kalter oder mit Chrompikrinsäure (gleichen Theilen von 1 $^0/_0$ iger Chromsäure und Pikrinschwefelsäure) oder mit Chromessigsäure oder mit konzentrirter Essigsäure (Genaueres s. im Original).

Maceriren. Ueber Hertwigs Gemisch s. oben § 530. Die Gewebe müssen wenigstens 24 Stunden in der Essigsäure bleiben und werden dann in Glycerin zerzupft. List (Zeit. Wiss. Mikr. 4. Bd. 1887 p. 211) behandelt die Tentakel von *Anthea* und *Sagartia* 10 Minuten lang mit 3 Theilen starkem Flemmingschem Gemisch und 10 Theilen Seewasser, wäscht sie 2 bis 3 Stunden lang mit $^1/_5$ $^0/_0$ iger Essigsäure und zerzupft sie in Glycerin; zum Färben nimmt er Pikrokarmin.

861. Korallen mit Kalkskelett sind wegen der grossen Kontraktilität der Polypen schwer zu konserviren. Lo Bianco (l. c. p. 446) verwendet je nach der Spezies Chromessigsäure und kalte oder heisse Sublimatlösung. Schliffe macht man nach Koch und Ehrenbaum (oben § 175 und 178), Schnitte von entkalkten Thieren nach den gewöhnlichen Methoden. S. auch oben § 551.

862. Alcyonarien. Auch diese haben sehr kontraktile Polypen. In einer früheren Auflage rieth ich zum Fixiren heisse Sublimatlösung oder Eisessig (oben § 71) an; Lo Bianco hat später Aehnliches angegeben.

Garbini (Manuale 1. Ed. Verona 1885 p. 151) fixirt die Polypen ausgestreckt durch Uebergiessen mit Aether und bringt sie dann in starken Alkohol. Wilson (Mitth. Z. Stat. Neapel 5. Bd. 1884 p. 3) tödtet sie mit einem Gemisch von 1 Theil Essigsäure und 2 Theilen konzentrirter Sublimatlösung, nimmt sie dann aber sofort heraus und härtet sie 2—3 Stunden lang in konzentrirter Sublimatlösung.

863. Zoantharien und Alcyonarien. Braun (Z. Anzeiger 9. Jahrg. 1886 p. 458) übergiesst *Alcyonium, Sympodium, Gorgonia* etc., wenn sie sich gut entfaltet haben, mit einem kochenden Gemisch von konzentrirter Sublimatlösung in Seewasser (20—25 ccm) und 1 $^0/_0$ iger Osmiumsäure (4—5 Tropfen), spült sie aber schon nach 5 Minuten mit

Seewasser ab und bringt sie in Alkohol von 30 und allmählich in stärkeren bis 90 %. (Diese Methode eignet sich auch für Bryozoen, Rotatorien und *Hydra*.)

864. Hydroiden. Ueber die Methoden zum Betäuben s. oben § 13 ff.

Fixiren. In der Regel tödtet man die Hydroiden durch Eintauchen in konzentrirte Sublimatlösung und bringt sie dann sofort in Alkohol; man nimmt gewöhnlich die Lösung kalt für die Gymnoblasten, heiss für die meisten Calyptoblasten. Die Campanulariden lassen sich auch gut durch vorsichtig angewandten Aether fixiren. *Hydra* tödtet man sehr leicht auf dem Objektträger durch einen Tropfen Lösung von Osmiumsäure; Breckenfeld (Amer. Month. Micr. Journ. Vol. 5 1884 p. 49) erhitzt sie auf dem Objektträger in einem Tropfen Wasser 3—5 Sekunden lang über einer Petroleumlampe. S. auch oben § 845 und § 863 die Methoden von Zograf und Braun. Lo Bianco (l. c. p. 451) begiesst die gut ausgestreckten Thiere mit heisser konzentrirter Sublimatlösung, bringt sie aber sofort in Süsswasser und 5 Minuten später in schwachen Alkohol. Für die Tubulariden genügt auch kalte Lösung.

Zum Schneiden bediene man sich der gebräuchlichen Methoden. Ueber die Anwendung von Methylenblau intra vitam s. oben § 288.

865. Fixiren der Medusen. Lo Bianco (l. c. p. 452) fixirt die Hydromedusen je nach der Spezies in ganz verschiedener Weise: die kleinen direkt mit einem Gemisch von 2 Theilen konzentrirter Sublimatlösung und 1 Theil Essigsäure, oder mit seinem Gemisch aus Sublimat und Kupfersulfat (oben § 56), die grösseren erst, nachdem sie durch Essigsäure getödtet worden sind, in seiner Chromosmiumsäure (1 %iger Chromsäure 50, 1 %iger Osmiumsäure 1 Theil) oder in 1 %iger Chromsäure. Für die Scyphomedusen verwendet er entweder direkt 1 %ige Osmiumsäure oder die Chromosmiumsäure oder Chromsäure (Genaueres s. im Original). Mir hat van Benedens Methode mit Essigsäure (oben § 71) die besten Dienste geleistet, dagegen scheint mir die Pikrinschwefelsäure, die ich für Medusen und ähnliche Objekte verwendet gesehen habe, histologisch doch recht bedenklich zu sein.

Die Arten mit langen Tentakeln lassen sich nur durch folgenden Kunstgriff fixiren. Man bewege die Schale mit der Essigsäure in der linken Hand so im Kreise, dass die Säure selber lebhaft rotirt, schöpfe inzwischen die Medusen mit möglichst wenig Seewasser in einen Löffel und lasse sie von diesem in die Säure fallen; dann werden sich die Tentakel hinter dem Thiere ganz lang aus-

strecken. Auch behandle man jede Meduse für sich, damit sich die Tentakel nicht in einander verwickeln. Sind sie gut fixirt, so bringe man die Medusen sorgfältig in Alkohol.

866. Schneiden der Medusen. Eine wirklich gute Methode zum Schneiden dieser so wasserreichen Thiere kenne ich gar nicht. Paraffin oder Kollodium erlauben wohl von manchen Organen gute Schnitte, taugen aber nicht für alle Gewebe. Die Hertwigs (Nervensystem der Medusen 1878 p. 5) betten die Medusen mit Hülfe von Gummiglycerin in Leber ein und härten das Ganze in Alkohol. Ich glaube, man würde bessere Resultate erhalten, wenn man eine der Gefriermethoden, die in § 179 bis 182 beschrieben sind, anwendete.

867. Maceriren der Medusen. Die Methoden der Hertwigs (oben § 530) sind mit Recht für das Studium der Gewebe der Medusen berühmt geworden. Ohne Zweifel würde aber oft die Reaktion mit Pyrogallussäure (§ 378) noch bessere Resultate liefern. Zur Isolirung der Elemente klopft man am besten sanft auf das Deckglas, das man auf Wachsfüsschen legen mag. Auch ein feiner Pinsel leistet manchmal gute Dienste.

868. Siphonophoren. Manche von ihnen sind so schwer zu konserviren wie nur irgend welche andere Thiere. Besonders fallen gern die Schwimmglocken, Deckstücke und Fangpolypen vom Stamme ab.

Bedot (Arch. Sc. Physiq. Nat. Genève (3) Tome 21 1889 p. 556) giesst von einer 15—20 %igen Lösung von Kupfersulfat eine grosse Menge auf einmal zu dem Seewasser mit den Siphonophoren. Nach etlichen Minuten, wenn sie fixirt sind, fügt er einige Tropfen Salpetersäure hinzu, um die Bildung von Niederschlägen zu verhindern, und lässt das Gemisch 4—5 Stunden lang stehen. Dann giebt er zur Härtung auf je 1 Vol. der Kupferlösung 2 Vol. starkes Flemmingsches Gemisch hinzu und lässt die Thiere wenigstens 24 Stunden darin. Zuletzt bringt er mit einer Pipette so vorsichtig wie möglich einige Tropfen 25 %igen Alkohols hinein und fährt mit dem Verstärken des Alkohols so langsam fort, dass dieser nicht vor 14 Tagen bis zu einer Stärke von 70 % gediehen ist. Zum endgültigen Aufheben dient 90 %iger.

Ich habe diese Methode geprüft und finde, sie erhält zwar die Thiere histologisch nicht besser als die gebräuchlichen Methoden, wird aber dadurch werthvoll, dass sie die Siphonophoren unverletzt, d. h. mit allen Anhängen in situ zu konserviren gestattet.

Friedländer (Biol. Centralbl. 10. Bd. 1890 p. 483) übergiesst die Thiere mit einem Gemisch von 1 Theil Kupfersulfat, 1 Theil Zinksulfat und 8 Theilen Wasser.

Lo Bianco (l. c. p. 454) tödtet die meisten Siphonophoren, indem er in das Seewasser mit den Thieren plötzlich die gleiche oder doppelte Menge seines Gemisches von Kupfersulfat und Sublimat (oben § 56) giesst; als Härtmittel dient ihm dann je nach der Spezies entweder Alkohol von 35 % (nach 2 Stunden 70 %) oder Flemmingsches Gemisch (2—6 Stunden lang) oder 1 %ige Chromsäure etc. *Rhizophysa* und *Diphyes* jedoch tödtet er mit heisser Sublimatlösung, *Physalia* mit Sublimat und Essigsäure, *Vellela* mit Chrompikrinsäure oder Chromsäure und Sublimat, *Porpita* durch Vergiftung mit Pikrinschwefelsäure.

Ueber Korotneffs Methode mit Chloroform s. oben § 15. Ich selber habe *Physophora* sehr gut durch vorsichtigen Zusatz von Aether tödten sehen.

Nach dem Fixiren und Auswaschen lassen sich die Siphonophoren statt in Alkohol viel einfacher in Formaldehyd aufbewahren (Weber). Davidoff (Anat. Anzeiger 11. Bd. 1896 p. 503) fixirt sie geradezu in Formol: in ein Gefäss voll einer 6—8 %igen Lösung davon stellt er den Glastubus, der die lebendige Siphonophore in Seewasser enthält, schräg (unter einem Winkel von etwa 30°) so auf, dass seine mit Watte locker verschlossene Oeffnung nach unten schaut. Die Formollösung diffundirt durch die Watte in etwa 1 Stunde nach oben und tödtet das Thier ausgestreckt und gut erhalten. Nachher kann man noch Osmiumsäure, Chromsäure etc. darauf einwirken lassen.

869. Ctenophoren. Die kleinen konservirt man sehr leicht mit Osmiumsäure. Für die grösseren verwendet Lo Bianco (l. c. p. 457) je nach der Spezies entweder seine Chromosmiumsäure (oben § 45) oder direkt Alkohol oder sein Kupfersulfat und Sublimat (oben § 56) etc.

Samassa (Arch. Mikr. Anat. 40. Bd. 1892 p. 157) bettet die Ctenophoren zum Schneiden in Celloidin und Paraffin (oben § 169) ein. S. auch oben § 171.

Poriferen.

870. Allgemeines. Die älteren Methoden findet man bei Vosmaer (Bronn, Class. Ordn. Thierreichs 2. Bd. 1884 p. 111—118) angegeben. In erster Linie wird zum Fixiren starker Alkohol, zum Präpariren der Kieselnadeln Kochen mit Salzsäure empfohlen.

871. Ganze Schwämme. Die kleineren Spezies lassen sich re- gut mit den gewöhnlichen Mitteln fixiren, besonders mit Osmiumsä- Für die grösseren ist mir hingegen noch kein befriedigendes Mittel beka- geworden. Die Gewebe sind nämlich sehr wasserreich und zart, n- dem Härten sehr brüchig und maceriren auch ungemein leicht. W- es scheint, ist für alle Spezies, mit Ausnahme der ganz klein- absoluter Alkohol das beste Fixirmittel. Zieht man jedoch ein wäs- riges vor, so bringe man nachher den Schwamm ja recht bald i- starken Alkohol, um die Maceration unmöglich zu machen. Fiedl- (Zeit. Wiss. Z. 47. Bd. 1888 p. 87) hat für *Spongilla* ausser d- absoluten Alkohol eine alkoholische Lösung von Sublimat sowie Pikri- schwefelsäure und Flemmingsches Gemisch erfolgreich angewandt.

Färben. Wegen ihrer grossen Neigung zum Maceriren (s. ob- werden die Schwämme wohl am besten in alkoholischen Färbmitt- tingirt; ich empfehle aus eigner Erfahrung speziell die Cochenilletink- Lendenfeld (Zeit. Wiss. Mikr. 11. Bd. 1894 p. 22) verwendet für d- Kragenzellen wässerige Lösungen von Anilinblau und Congoroth. S. au- die intravitale Färbung mit Congoroth (oben § 308 Loisel).

Schneiden. Die Kalkschwämme entkalkt man in Alkohol mi- etwas Salzsäure und bettet sie dann wie gewöhnlich ein. Die Kie- schwämme kann man nach Mayer (oben § 567) entkieseln. S. auch § 5-

Schleifen. S. oben § 176 die Methode von Johnston-La- & Vosmaer.

Ueber das Versilbern s. oben § 362.

872. Skelett. Die Kieselnadeln reinigt man leicht von den Weic- theilen durch Behandlung mit heisser konzentrirter Salpeter- oder Sa- säure oder mit Kali- oder Natronlauge. Die Säuren greifen allerdin- zarte Spicula mitunter an; so werden nach Dezsö (Arch. Mikr. An- 16. Bd. 1879 p. 627) die kleinen sternförmigen in der Rinde von *Te- lyncurium* von kochender Salzsäure ganz aufgelöst. Daher wird Kalilau- oft bessere Dienste leisten, obwohl sie nicht so reine Präparate gie- Nach Noll ist Eau de Javelle allen diesen Mitteln überlegen (s. oben § 54-

873. Embryonen und Larven. Maas (Z. Jahrb. Abth. Morph. 7. Bd. 1894 p. 334) fixirt die Cornacuspongien mit Larven am besten i- Flemmings Gemisch (die Larven 1—3 Minuten lang), die freien Larven auch wohl in Hermanns Gemisch. Färbung mit Boraxkarmin oder mit Gentianaviolett und Orange G nach Flemming.

Delage (Arch. Z. Expér. (2) Tome 10 1892 p. 421) bringt die Deckgläser mit den daran sitzenden Larven von *Spongilla* auf 3 Minuten in absoluten Alkohol, auf eben so lange in 70%igen, auf 10 Minuten in das alkoholische Karmin von Grenacher-Mayer, auf 1/2—2 Minuten in sauren Alkohol, auf je 3 Minuten in 70%igen und absoluten Alkohol, endlich eben so lange in Bergamottöl. Sollen die Larven geschnitten werden, so löst er sie nun ab und bringt sie auf drei Minuten in Paraffin; falls nicht, so kommen sie in situ in einen Tropfen Kanadabalsam, der auf einem anderen Deckglas liegt, sind somit von beiden Seiten her bequem sichtbar. Die Schnitte werden eventuell mit einer ganz schwachen Lösung von Bleu de Lyon nachgefärbt.

Protozoen.

874. Allgemeines. Da die Protozoen als frei lebende Zellen anzusehen sind, so lassen sich natürlich die in der Cytologie gebräuchlichen Methoden und Reagentien meist auch auf sie anwenden. Eins der nützlichsten ist das Methylgrün in saurer Lösung (oben § 283), denn es macht den Kern am raschesten und besten sichtbar (Balbiani & Henneguy in: C. R. Soc. Biol. Paris (7) Tome 3 1881 p. 131).

Zu den nützlichsten Reagentien, die aber weiter unten nicht erwähnt werden, rechne ich unter anderen schwache Lösungen von Alaun, Kaliumkarbonat und Borax als zur Demonstration der Streifen in der Cuticula und der Insertionen der Cilien bei den Infusorien geeignet. — S. auch Maggi, Tecnica protistologica (Milano 1895).

875. Methoden zur Lähmung der Infusorien. Hierher gehören zunächst die Methoden oben § 18—22. Ferner giebt nach Schürmayer (Jena. Zeit. Naturw. 24. Bd. 1890 p. 402; Zeit. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1891 p. 493) eine schwache Lösung (1:10000 oder noch schwächer) von Strychninnitrat bei *Stentor* und *Carchesium* gute Resultate; Antipyrin in konzentrirter Lösung (1:1000) oder Cocaïn (1:10000) scheinen nur den Stiel der gestielten Infusorien ausgestreckt zu lähmen.

Eismond (Z. Anzeiger 13. Jahrg. 1890 p. 723) verlangsamt die Bewegungen der Ciliaten (aber auch von kleinen Würmern und Krebsen) rein mechanisch durch Zusatz einer dicken Lösung von Kirschgummi (Gummi arabicum oder andere Klebmittel helfen nicht): die Thiere bleiben an Ort und Stelle, aber die Cilien schlagen ruhig, und alle Lebensprozesse gehen ihren gewohnten Weg. Certes (Bull. Soc. Z. France 16. Vol. 1891 p. 93) ist damit zufrieden und hat sogar die Thiere intra vitam durch Zusatz von Methylblau oder Dahlia („Violet Dahlia No. 170“) zum Gummi gefärbt. Jensen (Biol. Centralbl. 12. Bd.

1892 p. 558) verfährt ähnlich wie 1884 der Botaniker Stahl
Euglena: er löst 3 g Gelatine in 100 ccm warmem Wasser au
mischt von dieser Gallerte einen schwach erwärmten Tropfen mit e
Tropfen Infusorienwasser. Nimmt man weniger Gallerte, so kann
die Bewegungen verlangsamen oder auch die Thiere operiren
zerschneiden (bei 0,8 – 1 %).

876. Färben intra vitam. Die Möglichkeit, Protozoen le
zu färben, wurde zuerst von Brandt (Arch. Anat. Phys. Phys. Ab
1878 p. 563), einige Jahre später auch von Certes und Henneguy (B
Soc. Philom. Paris (7) Tome 5 1881 p. 52) beschrieben.

Brandt empfiehlt Bismarckbraun in Lösung von 1:3000 und (B
Centralbl. 1. Bd. 1881 p. 202) auch eine „verdünnte wässerige Häma-
xylinlösung" entweder direkt oder nach Bismarckbraun, (1:5000). Cer
(Bull. Soc. Z. France 6. Vol. 1881 p. 21, 226 u. 264; auch: Z. Anze
4. Jahrg. 1881 p. 208 und 287) verwendet schwache Lösungen
Cyanin, Bismarckbraun, Dahlia etc. und „Hämatoxylin". Gleich Br
löst er die Farbstoffe in dem Infusorienwasser selber und nimmt
nur ganz schwach (1:10000 und schwächer, von Cyanin 1:500
Ueber die Färbung des Kernes s. die vorläufige Mittheilung
Przesmycki (Biol. Centralbl. 17. Bd. 1897 p. 321).

Zuweilen ist auch die Beobachtung der ungefärbten Thi
in einem farbigen Medium nützlich. Hierzu empfiehlt Ce
(Bull. Soc. Z. France 13. Vol. 1888 p. 230) eine Lösung von An
schwarz, worin die Infusorien wochenlang am Leben bleiben. Fab
Domergue (Ann. Micrógr. Paris Tome 2 1889 p. 545) verwendet e
konzentrirte Lösung von Diphenylaminblau.

877. Fixiren, Schneiden etc. Pfitzner (Morph. Jahrb. 11. Bd. 18
p. 454) lässt konzentrirte Lösung von Pikrinsäure unter das Deck-
glas treten. Blanc (Z. Anzeiger 6. Jahrg. 1883 p. 22) nimmt ve
dünnte Pikrinschwefelsäure mit einer Spur Essigsäure, Entz (i
4. Jahrg. 1881 p. 575) giebt Pikrinschwefelsäure zu dem Infusorien-
wasser, Korschelt (ibid. 5. Jahrg. 1882 p. 217) verwendet 1 %
Osmiumsäure oder für Amöben 2 %ige Chromsäure, Landsberg (i
p. 336) ebenfalls Osmiumsäure, bringt aber die Thiere mit einer
Pipette in die Säure, statt diese unter das Deckglas treten zu lassen. -
Ueber das Fixiren mit Jodjodkalium oder Dämpfen von Jod s. oben
§ 76. — Cattaneo (Boll. Sc. Pavia Anno 5 1883 p. 89, 122; Journ.
R. Micr. Soc. London f. 1885 p. 538) fixirt die Thiere einige Minuten

ang mit einer $^1/_3$ $^0/_0$igen wässerigen Lösung von Chlorpalladium und ·ühmt dies Mittel sehr, Brass (Zeit. Wiss. Mikr. 1. Bd. 1884 p. 39) bedient sich des Sublimates oder eines Gemisches von je 1 Theil Chromsäure, Essigsäure und Platinchlorid und 400—1000 Theilen Wasser. Certes (Compt. Rend. Tome 88 1879 p. 433) fixirt mit 2 $^0/_0$iger Osmiumsäure, und zwar gewöhnlich mit ihren Dämpfen (10—30 Minuten lang).

Du Plessis (Vogt & Yung, Handb. Prakt. Vergl. Anat. 1. Bd. 1888 p. 85) fixirt die Protozoen mit einer $^1/_5$ $^0/_0$igen Lösung von Sublimat, lässt sie dann aber eintrocknen, färbt sie und schliesst sie in Balsam ein. Diese Methode scheint etwas roh zu sein, soll aber unter Umständen doch gute Präparate geben.

Fol (Lehrbuch p. 102) fixirt die Tintinnen mit seinem Eisenchlorid (oben § 70) und färbt sie dann mit Gerbsäure (§ 380); dies sei die einzige brauchbare Methode, besonders zur Erhaltung der Cilien. Hierfür empfiehlt Waddington (Journ. R. Micr. Soc. London (2) Vol. 3 1883 p. 185), zu dem Wassertropfen mit den Infusorien einen Tropfen einer Lösung von 1 Theil Tannin in 4 Theilen Glycerin oder eine Spur einer konzentrirten alkoholischen Lösung von schwefliger Säure (§ 58) zu setzen.

Lo Bianco (l. c. p. 444) konservirt die Gregarinen mit Pikrinschwefelsäure (1 Stunde lang), Vorticellen mit heisser Sublimatlösung, Acineten mit Sublimatlösung in Seewasser oder mit Osmiumsäure, von den Radiolarien *Thalassicolla* mit $^1/_2$ $^0/_0$iger Chromsäure (1 Stunde lang), die Acanthometren und Aulacanthen direkt mit 50 $^0/_0$igem Alkohol oder mit konzentrirter Sublimatlösung oder durch Zusatz von etwas Osmiumsäure zum Wasser. Für die Sphärozoeen befolgt er die Angaben von Brandt (s. folgenden §).

Zograf fixirt Rhizopoden und Infusorien wie die Rotatorien (s. oben § 845), aber ohne sie vorher zu betäuben.

Lauterborn (Zeit. Wiss. Z. 59. Bd. 1895 p. 170) fixirt die Ceratien vorzugsweise mit Flemmings Gemisch etwa 10 Minuten lang, bringt sie in Alkohol von 35—100 $^0/_0$, belässt sie in letzterem 24 Stunden, schafft sie wieder allmählich in Wasser, bleicht sie eventuell durch eine 3 $^0/_0$ige Lösung von Wasserstoffhyperoxyd und färbt sie mit Pikrokarmin oder Delafields Hämatoxylin. Beim Einbetten in Paraffin kommen sie aus dem Alkohol in sehr kleine Reagensgläschen und werden hierin mit Chloroform etc. behandelt; zuletzt wird das Glas zerschlagen, und man hat dann die Ceratien alle auf einem kleinen Raum beisammen eingebettet. Färbung der Schnitte mit Eisenhämatoxylin.

Fabre-Domergue (Ann. Microgr. Paris Tome 1 1889 p. 518) fixirt die Protozoen am besten mit Osmiumsäure (1 %) oder einem Gemisch gleicher Theile 1 %iger Osmiumsäure und 20 %iger Essigsäure unter dem Deckglase. Auch kann man von vorneherein etwas Methylgrün hinzufügen. Zum Aufbewahren ist besonders gut das Gemisch von Brun (oben § 420) oder verdünntes, leicht mit Methylgrün gefärbtes Glycerin. Einschluss in Balsam wie gewöhnlich. — Derselbe Autor (ibid. Tome 2 1890 p. 50) verwendet für Infusorien eine konzentrirte Lösung von Osmiumsäure, die auch bei der Methode von Balbiani (s. unten) gute Dienste leistet. Zum Schneiden nimmt er jedesmal nur ein einziges, vorher mit Pikrokarmin gefärbtes Thier und bettet es in einem mit Glycerin bestrichenen Uhrschälchen in filtrirtes Paraffin ein. S. auch oben § 129 p. 75.

Balbiani (Z. Anzeiger 13. Jahrg. 1890 p. 133) fixirt *Loxophyllum* in Osmiumsäure (1/2—1 %ig), färbt es mit Methylgrün und Essigsäure, behandelt es unter dem Deckglas mit schwachem Ammoniak (1—2 Tropfen auf 15—20 ccm Wasser) und wäscht letzteres durch Methylgrün, das in Wasser ohne Essigsäure gelöst ist, wieder aus. Es zeigen sich dann allerlei Einzelheiten im Kern.

Longhi (Boll. Mus. Z. Anat. Comp. Genova No. 4 1892; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1893 p. 483) empfiehlt zum raschen Tödten der Protozoen eine Lösung von Eserinsulfat (1,1 %), der auf je 10 ccm 1 Tropfen einer 1 %igen Lösung von Sublimat zugesetzt ist.

Nach Schaudinn (Zeit. Wiss. Z. 59. Bd. 1895 p. 193) eignet sich für *Calcituba* nur 1 %ige Osmiumsäure oder ein Gemisch von 1 Theil wässerigem Sublimat mit 2 Theilen absolutem Alkohol.

Karawaiew (Z. Anzeiger 18. Jahrg. 1895 p. 286) fixirt *Aulacantha* 1 Tag lang in einem Gemisch von Eisessig und starkem Flemmingschen Gemisch zu gleichen Theilen und bringt sie dann auf 1 bis mehrere Tage in letzteres Gemisch.

878. Sphärozoeen. Brandt (Fauna Flora Golf. Neapel 13. Monogr. 1885 p. 7) empfiehlt je nach der Spezies zur Abtödtung entweder 1/2—1 %ige Chromsäure (1/2—1 Stunde lang) oder Jodspiritus (70 %iger Alkohol mit der gleichen Menge Seewasser und etwas Jodtinktur; 1/4—1/2 Stunde, dann Süsswasser und 30—70 %iger Alkohol) oder eine 5—15 %ige Sublimatlösung in Seewasser.

879. Sporozoen. Wasielewski (Sporozoenkunde Jena 1896 p. 15) legt besonders grossen Werth auf die Untersuchung der lebendigen

Thiere entweder in ihrem natürlichen Medium oder in Normalsalzwasser oder Eiweisslösung (20 ccm Hühnereiweiss, 200 ccm Wasser, 1 g Kochsalz). Zum Fixiren der Gregarinen und Coccidien dienen Osmiumsäure, Sublimat, Pikrinessigsäure, der Myxosporidien Flemmings Gemisch; die Hämosporidien und Acystosporidien werden, auf dem Deckglas angetrocknet, mit Flemmings Gemisch behandelt und mit Methylenblau und Eosin nach Chenzinski (oben § 314) oder mit Delafields Hämatoxylin, Säurefuchsin (oder Bengalroth) und Aurantia gefärbt. Für Gregarinen sind Färbungen mit Safranin, Pikrokarmin etc., ausserdem Behandlung mit Goldchlorid, Höllenstein, Essigsäure, Ammoniakwasser geeignet, für die Myxosporidien Färbung mit Safranin oder Gentianaviolett und Eosin.

880. Färben der Geisseln. Von Löfflers Methode (Centralbl. Bakt. Parasitk. 6. Bd. 1889 p. 209; 7. Bd. 1890 p. 625; Zeit. Wiss. Mikr. 6. Bd. 1889 p. 359; 7. Bd. 1890 p. 368) sei hier die neueste Form gegeben. Zu 10 ccm einer Lösung von 20 g Tannin in 80 ccm Wasser setze man 5 ccm einer gesättigten Lösung von Eisenoxydulammoniumsulfat und 1 ccm einer wässrigen oder alkoholischen Lösung von Fuchsin, Methylviolett oder Wollschwarz. (Hierzu kommt für einige Bacillen eine Spur Natronlauge, für andere eine Spur Essig- oder Schwefelsäure.)

Mit einem Tropfen obigen Gemisches werden die auf einem absolut reinen Deckglase in der bekannten Weise angetrockneten Bakterien, Flagellaten etc. $^1/_2$—1 Minute lang erwärmt, bis Dämpfe aufsteigen, dann in destillirtem Wasser und in absolutem Alkohol gewaschen und darauf ebenso mit einer konzentrirten Lösung von Fuchsin in Anilinwasser behandelt, die man am besten vorher durch Hinzufügen einer $^1/_{10}\,^0/_0$igen Lösung von Aetznatron genau neutralisirt hat.

Bunge (Centralbl. Bakt. Parasitk. 16. Bd. 1894 p. 217 und 700; Zeit. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 96) nimmt zur Beize auf 15 ccm der Tanninlösung 5 ccm verdünnten (1 : 20) Liq. Ferri sesquichlorati und 2 ccm einer gesättigten wässerigen Lösung von Fuchsin; man muss aber dieses Gemisch vor dem Gebrauch einige Zeit an der Luft reifen lassen oder (Journ. R. Micr. Soc. London f. 1895 p. 248) ihm einige Tropfen Wasserstoffhyperoxyd zusetzen, bis es rothbraun wird. Es wird dann umgeschüttelt und direkt auf das Deckglas filtrirt; eine

Minute später wird abgespült, das Deckglas getrocknet und gefärbt am besten mit Karbol-Gentianaviolett.

S. auch Trenkmann (Centralbl. Bakt. Parasitk. 6. Bd. 1889 p. 433; Z. f. Wiss. Mikr. 7. Bd. 1890 p. 79), Brown (Journ. R. Micr. Soc. London f. 1894 p. 268), Julien (ibid. f. 1894 p. 403), van Ermengem (ibid. p. 405), Sclavo (Z. f. Wiss. Mikr. 13. Bd. 1896 p. 96) und Hessert (ibid. p. 98: ohne Beize).

Fischer (Jahrb. Wiss. Bot. 26. Bd. 1894 p. 188) hat die ältere Methode von Löffler mit Erfolg auf Flagellaten angewandt.

Anhang.

881. Reinigen von Objektträgern und Deckgläsern. Eine Menge Vorschriften zur Reinigung neuer und gebrauchter Gläser sind von Zoologen, Bakteriologen, Photographen etc. veröffentlicht worden (s. Lee, 4. Ed. § 884). Sie laufen im Wesentlichen darauf hinaus, dass man neues Glas, wie man es vom Händler erhält, zunächst in eine starke Säure (konzentrirte Schwefelsäure, Salpetersäure, Chromsäure oder Schwefelsäure, Wasser und Kaliumbichromat) legt, dann gut mit Wasser, darauf mit Alkohol von 90 % abspült und mit einem reinen Lappen abtrocknet.

Gebrauchte Objektträger und Deckgläser müssen, wenn sie noch das Präparat selber oder Reste davon (Lackränder etc.) enthalten, zunächst hiervon befreit werden. Dies geschieht am einfachsten durch Erwärmen: der Balsam etc. wird weich, und nun schiebt man das Deckglas über den Rand des Objektträgers hinaus und lässt es in ein Gefäss mit gebrauchtem Xylol, Benzol etc. gleiten, worin sich der Balsam spätestens in einigen Tagen verflüssigen wird. Die Objektträger legt man ebenfalls in eine solche Flüssigkeit, aber nicht mit den Deckgläsern zusammen, um Bruch zu vermeiden. Das nächste Bad ist gebrauchter starker Alkohol; sollten sie aber noch nicht ganz rein sein, so kann man sie nach flüchtigem Abtrocknen an der Luft nochmals in das Xylol etc. bringen oder in eine der obigen Säuren.

882. Auffrischen verblasster Präparate. (Lee & Henneguy, Traité 2. Ed. 1896 p. 476). Man hat nichts weiter zu thun, als das Präparat in ein Gefäss mit Xylol oder Benzol zu stellen; nach etwa 2 Tagen ist das Deckglas zu Boden geglitten, dann behandelt man das Präparat noch einige Stunden lang mit reinem Xylol und bringt es durch die Alkohole in das Färbmittel. Verwenden lässt sich diese Methode aber mit Sicherheit nur bei Schnitten, die entweder mit Wasser oder mit Eiweiss aufgeklebt sind; ob das Kollodium (nach Schällibaum) Stand

halten würde, wäre noch zu probiren, und mit Schellack geht es natürlich nicht, da dieser sich ja in Alkohol löst. E. Meyer (Biol. Centralbl. 10. Bd. 1890 p. 509) hilft sich damit, dass er Deckglas und Balsam durch Chloroform entfernt, dann rasch eine 2 % ige Lösung von Photoxylin oder Celloidin aufgiesst, einige Sekunden später den Objektträger in 70 % igen, dann zur Lösung des Schellacks in 90 % igen Alkohol bringt, darauf in 70 % igem das Häutchen mit den Schnitten vom Glase ablöst und nun entweder nachfärbt oder direkt wieder in Balsam einschliesst.

Nachträge während des Druckes.

883. Iridiumchlorid wird von Eisen (Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 195) zum Fixiren der Gewebe oder Embryonen und Larven von Salamandern empfohlen: $^1/_2$ %ige Lösungen von Platinchlorid und Iridiumchlorid je 50 Theile, Eisessig 1 Theil; oder noch besser: Iridiumchlorid in $^1/_2$ oder $^1/_5$ %iger Lösung 100 Theile, Eisessig 1 Theil. Zum Auswaschen in destillirtem Wasser genügen einige Stunden. Die Objekte sind durchaus gleichmässig fixirt, nicht brüchig, nach dem Waschen rein weiss und färben sich gut.

884. Eisen (Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 197) benutzt zum Aufkleben der Paraffinschnitte Alkohol von 80%, bedeckt die Schnitte aber, nachdem sie sich in der Wärme gestreckt haben, mit Fliesspapier, rollt einen metallenen Stab „with considerable force“ über sie hin und bürstet sie zuletzt mit einem weichen Pinsel ab. Diese heroischen Mittel sollen nicht schaden.

885. Kopsch (Arch. Mikr. Anat. 51. Bd. 1897 p. 184) fixirt die Embryonen von *Salmo* nach der Vorschrift von Virchow 5—10 Minuten lang in Chromessigsäure (Chromsäure 1, Eisessig 50, Wasser 450), bringt sie dann provisorisch in Chromsäure von 1 : 500, darauf in Salzwasser (0,7 bis 1%), entfernt darin Eischale und Dotter und legt sie nun wieder in die Chromessigsäure oder in konzentrirte Sublimatlösung.

886. (Nachtrag zu § 88.) Als einfaches Mittel zur Erkennung von Wasser in absolutem Alkohol empfiehlt Yvon (Compt. Rend. Tome 125 1897 p. 1181) den Zusatz groben Pulvers von Calciumcarbid: auch eine Spur Wasser ruft die Entwickelung von Acetylengas hervor, und beim Umschütteln wird der Alkohol durch das entstandene Kalkhydrat trübe. Auch zur Herstellung absoluten Alkohols aus 95—90%igem kann das Calciumcarbid dienen, jedoch muss der Alkohol später zweimal destillirt werden (das 2. Mal über entwässertem Kupfersulfat).

887. (Nachtrag zu § 90 p. 52.) Nach Kenyon (Science (2) Vol. 6 1897 p. 737) ist gegen die Dämpfe von Formaldehyd am besten Ammoniak zu verwenden, das man entweder in offenen Schalen verdunsten lässt oder dem Wasser zusetzt, mit dem man jenes aus den Objekten auswäscht.

888. (Nachtrag zu § 137 p. 83 u. 84.) Held (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. 1897 p. 345) beschreibt einen Apparat zum Erwärmen oder Abkühlen des Paraffinblocks und des Messers. Ein Strom kalten oder warmen Wassers zirkulirt in einem dünnen Bleirohr, das den Rücken des Messers umgiebt, und in einem Kästchen um das Paraffin. Letzteres darf bei 56° C. schmelzen; durch Abkühlung auf 14° C. erhält man gute Schnitte bis zu 1 μ, durch Erwärmung auf 26½° solche von 100 μ.

889. (Nachtrag zu § 137 p. 84 u. 85.) Ueber den Einfluss der Neigung der Schneidfläche des Messers gegen die Horizontale und der Stellung des Messers überhaupt auf die Güte der Schnitte s. Apáthy (Med. Nat. Mitth. Klausenburg 1897; Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 157 u. 332).

890. (Nachtrag zu § 263 p. 158.) Nach Held (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. Suppl. 1897 p. 277) färbt man mit Hämatoxylineisen besser, wenn der Hämatoyxlinlösung von vornherein so viel Eisenalaun zugesetzt wird, dass „kein nennbarer Niederschlag bleibt".

891. (Nachtrag zu § 633.) **Molybdänsäure** als „mikroskopisches Reagens" empfiehlt Heine (Zeit. Phys. Chem. 22. Bd. 1896 p. 132). Sie zeigt zwar nicht, wie Lilienfeld & Monti meinen, die Gegenwart von Phosphor in den Geweben an, denn auch viele phosphorfreie Stoffe geben dieselbe Reaktion (eine blaue, grüne oder braune Färbung durch Reduktion der Molybdänsäure), ist aber z. B. für die Demonstration der chromatischen Spindel etc. in Präparaten vom Hoden von *Salamandra* zu brauchen. Celloidinschnitte von Material aus Alkohol werden 15 Stunden lang mit „salpetersaurer Ammoniummolybdatlösung" behandelt, gut ausgewaschen und auf 10—15 Sekunden in eine Lösung von Zinnchlorür (in Wasser oder Alkohol), von da durch Origanumöl in Balsam gebracht. S. auch Altmann (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. f. 1892 p. 224; Zeit. Wiss. Mikr. 9. Bd. 1893 p. 331): eine 2½ %ige Lösung von Ammoniummolybdänat mit ¼ % Chromsäure.

892. (Nachtrag zu § 284.) **Metaphenylendiamin** ist nach Unna (Monatsh. Prakt. Derm. 6. Bd. 1887 No. 2) in wässeriger Lösung ein sehr guter graubrauner Kernfarbstoff. Setzt man zu der Lösung auf jede Messerspitze voll dieses Salzes einen Tropfen einer 1—5 %igen Lösung von Natriumnitrit, so entsteht sofort Bismarckbraun und ist ohne Weiteres zum Färben verwendbar.

893. (Nachtrag zu § 72 und 681.) Ohlmacher (Journ. Exp. Med. Vol. 2 1897 p. 673) fixirt die Gewebe in einem Gemisch ähnlich dem von Carnoy (absoluter Alkohol 80, Chloroform 15, Eisessig 5, Sublimat bis zur Sättigung, also etwa 20 Theile). Gewöhnlich genügen 15—20 Minuten; Menschenhirne erfordern 18—24 Stunden. Auswaschen in Alkohol von 80 % mit Kampher oder Jodtinktur. Die Färbung nach Nissl gelingt an diesem Material leicht.

894. (Nachtrag zu § 612 und 884.) Bengtsson (Handl. Fysiogr. Sällsk. Lund (2) 8. Bd. 1897) findet für die Dipterenlarve *Phalacrocera* zum Fixiren

weitaus am besten heissen Sublimatalkohol nach Frenzel (oben § 62). Die Eau de Javelle zum Erweichen des Chitins hat stets versagt.

895. (Nachtrag zu § 709.) Gudden (Neur. Centralbl. 16. Jahrg. 1897 p. 24) legt Celloidinschnitte von Material, das mit 5—10 %iger Formollösung und dann mit 96 %igem Alkohol fixirt worden ist, auf 10 Stunden in eine 0,55 %ige Chromsäure, spült sie mit Wasser ab, tränkt sie kurz mit 80 %igem Alkohol und findet sie nun für die Färbung nach Weigert und Pal geeignet, besonders wenn man der Hämatoxylinlösung etwas verdünnte Salpetersäure hinzufügt.

896. (Nachtrag zu § 712.) Scarpatotti (Neur. Centralbl. 16. Jahrg. 1897 p. 211) härtet Gehirn oder Rückenmark 8 Tage bis Monate lang in 5—10 %igem Formol, dann in 95 %igem Alkohol, und bringt die Celloidinschnitte zuerst in die Hämatoxylinlösung (1 %), dann nach 5 Minuten in konzentr. Lösung von Kupferacetat, nach weiteren 5 Minuten in das Gemisch von 4 Theilen Borax, 5 Theilen rothem Blutlaugensalz und 200 Theilen Wasser, endlich in die Lösung des Lithiumkarbonates.

897. (Nachtrag zu § 722.) Ohlmacher (Journ. Exp. Med. Vol. 2 1897 p. 675) färbt aufgeklebte Schnitte 1 Minute lang mit Ehrlichs Gentianaviolett in Anilinwasser (§ 279), wäscht sie, färbt sie einige Sekunden lang in einem Gemisch von 200 Theilen halbgesättigter Lösung von Pikrinsäure und 1 Theil Säurefuchsin, wäscht sie erst mit Wasser, dann mit Alkohol (meist höchstens $1/2$ Minute lang) und bringt sie durch Nelkenöl in Xylolbalsam.

898. (Nachtrag zu § 719.) Frey (Arch. Anat. Phys. Anat. Abth. Suppl. 1897 p. 108) färbt die Markscheiden der Hautnerven, indem er ganz kleine Stücke menschlicher Haut in einer 2 %igen Lösung von Ammoniumbichromat mindestens 2 Wochen lang im Eisschrank härtet, nach kurzem Waschen mit Wasser auf 1 Stunde in Goldlösung (1 %ig mit 1 % Salzsäure) und von da nach Abspülung auf 24 Stunden im Dunkeln in $1/50$ %ige Chromsäure bringt. Die Stücke schneidet er ohne Einbettung mit dem Gefriermikrotom, lässt die 30—50 μ dicken Schnitte auf dem Objektträger antrocknen, wäscht sie gut mit einer starken Lösung von Natriumhyposulfit, trocknet sie nochmals und schliesst sie in Balsam ein. Das Gold liegt als feinste Körnchen in den Markscheiden (s. auch oben p. 221), sowie in der Wand der Fettzellen.

899. (Nachtrag zu § 768.) Mallory (Journ. Exp. Med. Vol. 2 1897 p. 532) fixirt zur Erforschung der Neuroglia die nicht über $1/2$ cm dicken Stücke wenigstens 4 Tage lang in 10 %igem Formol, bringt sie dann auf 4—8 Tage in gesättigte Lösung von Pikrinsäure, von da auf 4—6 Tage bei 37° C. (oder auf 4 Wochen bei gewöhnlicher Temperatur) in 5 %ige Lösung von Ammoniumbichromat, die er am 2. Tage wechselt, endlich direkt in Alkohol. Die Celloidinschnitte färbt er nach der Weigertschen Fibrinmethode (oben § 806; zur Entfärbung gleiche Theile von Anilin und Xylol) oder mit Hämatoxylin-Molybdänat (oben § 734).

900. (Nachtrag zu § 700.) Eine komplizirte Methode mit Pikrinschwefelsäure, Erlickis Gemisch, Höllenstein, Hämatoxylin und Molybdänsäure zur Färbung

der Axencylinder und ihrer Endbäumchen beschreibt Auerbach (Neur. Centr[?] 16. Jahrg. 1897 p. 439; Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 1897 p. 402).

901. (Nachtrag zu § 294 und 704.) Zur Darstellung der Neurofibrill[?] bei *Carcinus* s. auch Bethe (Arch. Mikr. Anat. 51. Bd. 1898 p. 385 ff.), d[?] Apáthys Resultate im Wesentlichen bestätigt. Einige Angaben über die Färbu[?] mit Methylenblau und über eine neue Methode mit Toluidinblau nach Beizu[?] mit Molybdänsäure.

902. (Nachtrag zu § 289 und 550.) Die Lorenzinischen Ampullen d[?] Selachier untersucht Peabody (Z. Bull. Boston Vol. 1 1897 p. 164) mit Methyl[?] blau. Zur Injection der Kanäle dient Celloidin, das mit Berlinerblau ver[?] ist; korrodirt wird dann der Kopf mit 20%iger Salpetersäure.

903. (Nachtrag zu § 831 und 832.) Bernard (Ann. Sc. N. (7) Tome[?] 1890 p. 100) bedient sich zum Nachfärben der mit Gelatine (oben § 1[?] aufgeklebten Schnitte durch den Mantel der Prosobranchier einer stark[?] Lösung von Methylgrün oder Methylenblau in absol. Alkohol und Xylol [?] gleichen Theilen); speziell für die Nerven einer Lösung von Methylenblau [?] absol. Alkohol mit etwas fester Chromsäure. Das Epithel macerirt er (p. 10[?]) in einem Gemisch von je 1 Theil Glycerin und Essigsäure, je 2 Theilen Alkoh[?] von 90% und Chromsäure von 1/10% und 40 Theilen Wasser. Dieses wirk[?] bereits in 1/4—3 Stunden. Auch (p. 102, 306) Chlorruthenium in schwach[?] Lösung ist gut, besonders für die Nervenbahnen, Schleimzellen und Cili[?] Bereits in Alkohol befindliche Gewebe lassen sich nachträglich maceriren [?] einem Gemisch von Glycerin (1), Essigsäure (2), Alkohol (2) und Wasser (4[?]

904. (Nachtrag zu § 127 und 179.) Eine Einrichtung am Gefrier[?] mikrotom zur Verwendung flüssiger Kohlensäure statt des Aethers beschr[?] Johne (Zeit. Thiermed. (2) 1. Bd. 1897 p. 366; Zeit. Wiss. Mikr. 14. Bd. 18[?] p. 370). Für Stücke von 8—10 mm Dicke und 2 cm Länge und Breite soll [?] genügen, die Kohlensäure nur 3—5 Sekunden lang ausströmen zu lassen.

905. (Nachtrag zu § 637.) Zu Macallums vorläufiger Mittheilung ü[?] Hämatoxylin zur Unterscheidung von organischen und anorganischen Ei[?] salzen ist die ausführliche Arbeit erschienen (Journ. Phys. Cambridge Vol. [?] 1897 p. 92).

906. (Nachtrag zu § 706 ff.) Weigert (Anat. Hefte 2. Abth. 6. Bd. 1[?] p. 3 ff.) bespricht ausführlich die Färbung der Markscheiden.

Register.

Die Zahlen geben die Seiten an. ä = ae, ö = oe, ü = ue. Was man bei C nicht findet, suche man bei K.



